



Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

**Estudio de la capacidad antiviral de
Ribavirina y Nano-partículas de plata en
células infectadas con Bunyavirus
mediante técnicas de imagen**

Tesis Doctoral

Moisés García Serradilla

Madrid, 2019



Departamento de Biología Molecular
Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias

Estudio de la capacidad antiviral de Ribavirina y Nano-partículas de plata en células infectadas con Bunyavirus mediante técnicas de imagen

Memoria presentada para optar al grado de Doctor por:
Moisés García Serradilla, Licenciado en Biología

Directora de Tesis:
Cristina Risco Ortiz

Centro Nacional de Biotecnología (CNB)-CSIC



Este trabajo de tesis ha sido realizado en el Laboratorio de Estructura Celular del Departamento de Estructura de Macromoléculas del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC) con un contrato de Titulado Medio de Actividades Técnicas y Científicas y Profesionales, asociado al Proyecto (BIO2015-68758-R). Factorías de replicación de virus ARN: de la biología estructural celular a los tratamientos antivirales.

Investigador principal:
Dra. D^a Cristina Risco Ortiz.

A mis queridos padres, Nieves y Moisés
Gracias por vuestra dedicación incondicional

En primer lugar y de forma especial quiero agradecerle a la Dra. Cristina Risco que me diera la oportunidad de hacer la tesis en su laboratorio. Gracias por enseñarme tanto durante estos años, mi admiración por todos los trabajos que se realizan en el grupo y orgullo de haber podido participar.

A continuación, quiero dar las gracias a mis queridos compañeros y compañeras de laboratorio, porque no podrían ser mejores. Luca gracias por acogerme tan bien y enseñarme en los inicios, a mis compañeras doctoras que tanto me han enseñado, aconsejado y ayudado, me gustaría agradecer vuestra dedicación y me alegro de haber podido trabajar a vuestro lado, Laura, Beatriz, Raquel e Isabel. En especial me gustaría agradecerle a Isabel, porque eres y has sido un ejemplo a seguir y porque siempre has estado para todo. Sara gracias por estar siempre pendiente para ayudarnos y mucha suerte en esta nueva etapa de la que seguro haréis un trabajo muy bueno. A Paula y Alberto que os voy a decir, muchas gracias por hacerme sentir tan bien y los buenos ratos pasados, vais a realizar unas tesis de una calidad espectacular, sin duda.

En estos años he aprendido de muchas otras personas, compañeros del CNB como de otros centros. Gracias a todos los que me habéis aportado tanto durante los seminarios de grupo, Carmen San Martín, Gaby, Maite Rejas y Marta. Al profesorado del master de Virología que me enseñaron mucho y despertaron las ganas de seguir aprendiendo.

A Beatriz Praena sin tu simpatía y apoyo recibido los congresos no hubieran sido lo mismo. Muchas gracias a todos los servicios del CNB, en especial al servicio de Microscopía Electrónica (Cristina Patiño, Javier Bueno y Beatriz), al servicio de Microscopía Confocal (Dra. Sylvia Gutiérrez y Ana Oña) y al servicio de citometría (M^a del Carmen y Sara) por su apoyo y valiosos consejos durante la tesis.

Esti, tengo ganas de ver tu pedazo de tesis, gracias por dejarnos vivir en tus tierras.

A mis amigos, a todos ellos, muchas gracias.

Muchas gracias a mi familia, a mi hermano Jorge por estar siempre para lo que necesitare, a María y mis sobrinas Ariadna y Paula, la alegría de la casa, a mi tía María Ignacia, a quien prefiero seguir llamando tía Chichi como hago desde que era un niño.

Muchísimas gracias a mi madre Nieves y a mi padre Moisés, por tantísimas cosas...

Muchas gracias a todos

Planeta ertain baten inguru disitiratsuan,
itsaso ilun batean gure munduak igeri dabiltzan lekuan
Unibertsoaren geletan zu zaude nire zain,
azala lore eta mingain zaporeko txinpartaz josten zait

Maite zaitut Lide

Resumen

One of the most important consequences of climate change is the rapid dissemination of the vectors of arboviruses such as Dengue, Zika, Chikungunya and Bunyaviruses. These viruses constitute a global threat because there are currently no vaccines nor specific antiviral drugs for many of them. With fluorescent recombinant bunyaviruses and Correlative Light and Electron Microscopy (CLEM), combined with other virology and cell biology methods, we have studied the response of Vero cells to bunyavirus infection and the effects of two different antivirals, that are Ribavirin (RBV) and Silver Nanoparticles (AgNPs).

Bunyamwera virus (BUNV), the prototype of the order Bunyvirales, assembles small replication factories in Vero cells. These structures are made of fragmented Golgi stacks surrounded by mitochondria and Endoplasmic Reticulum (ER) cisternae. With the fluorescent, recombinant virus rBUNGc-eGFP and live cell imaging, it was observed that BUNV particles accumulate in large vacuolar structures that are transmitted from cell to cell. This is a new way of bunyavirus transmission that in Vero cells works together with the reported constitutive secretion of viruses in secretory vesicles. In addition, we observed that BUNV is able to induce drastic changes in the nucleus and nucleolus of Vero cells. Notably, the nucleolus progressively fragments and disappears in BUNV-infected Vero cells, feature that is a genuine hallmark of BUNV infection in Vero cells. Through the use of the mutant rBUN-DelNSs that lacks the non-structural protein (NSs), it was found that NSs is responsible for the disorganization of the nucleus and nucleolus and might also participate in the biogenesis of the viral factory.

RBV and AgNPs blocked the infection in ~ 90% of cells. Those cells where the virus escaped from the antiviral treatment, were selected and studied in detail. A small percentage of cells (~3%) presented a peculiar phenotype. In these cells, it was found for the first time that RBV and AgNPs altered the structure of the spherules that contain the viral replication complexes in Golgi stacks. This apparently impaired BUNV replication and as a consequence, diminished the cytopathic effect. At early times post-treatment AgNPs located in the nucleus and in mitochondria and at late times post-treatment they were found in membranous organelles, what could be contributing to the toxicity of the drug. Finally, with plaque assay experiments viruses that were able to replicate in the presence of RBV were isolated. Cells infected with these viruses produced low viral titres and a less severe cytopathic effect than wild type BUNV. The viruses that escaped the RBV treatment do not build their factory in the Golgi complex but in a different organelle.

The findings of this investigation demonstrate that the combination of advanced light and electron microscopy methods is of considerable help to unveil the mechanism of action of antiviral drugs and how resistance to antivirals is developed in cells. Detailed studies of toxicity and combined therapies with more than one drug will be necessary to combat emerging and re-emerging viruses.

Índice

Resumen	i
Índice	vii
Abreviaturas	xv
Introducción	1
1.- Arbovirus	4
2.- Vectores artrópodos	4
3.- Orden bunyavirales	6
3.1-Virus Bunyamwera	7
3.2.- Morfología y genoma viral	7
3.3.- Proteínas virales	8
3.4.- Ciclo de replicación viral	10
3.5.- Ensamblaje y morfogénesis viral. La Factoría viral	13
4.-El núcleo y nucléolo celular en las infecciones virales	15
5.-Desarrollo de fármacos antivirales eficaces	17
5.1.- Reposicionamiento de fármacos	18
6.- Ribavirina (1-β-D-ribofuranosyl-2,4-triazol-3-carboxamida)	19
6.1.-Mecanismos de acción de RBV	19
6.2.- Metabolismo y toxicidad de RBV	20
7.- Nanopartículas de plata (AgNPs)	20
7.1.- Mecanismos de acción	21
7.2.- Síntesis de AgNPs	22
7.3.-Toxicidad	22
8.-Técnicas de imagen como herramienta para el estudio de fármacos antivirales	23
Objetivos	27
Materiales y métodos	31
1.- Materiales	33
1.1.- Células y virus	33
1.2. Anticuerpos	33
1.3. Sondas	34
1.4. Otros reactivos	34

2.- Análisis Bioquímicos	35
2.1.- Transferencia e inmunodetección (western blot)	35
3.- Biología celular y Virología	36
3.1.- Cultivo de células Vero	36
3.2.- Infección de las células Vero	37
3.3.- Tratamiento con drogas	39
4.- Microscopía óptica de fluorescencia	41
4.1.- Inmunofluorescencia indirecta (IFI)	41
4.2.- Protocolo para marcaje de proteínas nucleares	42
4.3.- Microscopía de células vivas	42
4.4.- Análisis y procesamiento de las imágenes de microscopía confocal	42
5.- Microscopía electrónica de transmisión	43
5.1.- Inclusión en resina para el estudio de la ultraestructura de monocapas celulares orientadas	43
5.2.- Obtención de secciones ultrafinas	43
5.3.- Tinción de muestras para microscopía electrónica	44
5.4.- Tinción negativa de virus	44
5.5.- Inmunomarcaje de criosecciones mediante el método de Tokuyasu	44
6.- Microscopía correlativa óptica-electrónica (CLEM)	46
Resultados	49
1.- Descripción de la factoría de VBUN en células Vero	51
1.1.- Estudio de la infección mediante microscopía de fluorescencia y microscopía Electrónica	51
1.2.- Estructuras virales ensambladas por rBUNGc-eGFP en células Vero visualizadas mediante microscopía de células vivas y microscopía correlativa óptica-electrónica	56
1.3.- Caracterización de los cambios en la estructura nuclear causados por la infección de VBUN	61
1.4.- Estudio de la proteína NSs en células Vero	63
1.4.1.- Localización de NSs en células Vero	63

1.4.2.- NSs se localiza en mitocondrias. Estudios de MF e inmunomarcaje en criosecciones para ME	69
1.5.- Estudio de la factorial viral en células Vero infectadas con el virus recombinante rBUN-DelNSs	72
1.5.1.- Estructura del núcleo y la factoría viral en células Vero infectadas con rBUN-DelNSs a tiempos largos de post-infección	75
2.- Ribavirina	77
2.1.- Efectos de la Ribavirina en células Vero infectadas por VBUN	77
2.2.- Estudio de los efectos de RBV mediante CLEM y ME	82
2.3.- Cuantificación de estructuras virales en células infectadas por VBUN frente a células infectadas y tratadas con RBV	85
2.4.- RBV altera la morfología del dominio globular de los ORs	86
2.5.- La multiplicación de VBUN en presencia de RBV da lugar a variantes del virus con infectividad y patogenicidad reducidas	87
3.- Nanopartículas de plata AgNPs	95
3.1.- Estudio del efecto antiviral de AgNPs en células Vero infectadas con VBUN	95
3.2.- Las AgNPs se unen a VBUN <i>in vitro</i>	96
3.3.- MF de células Vero infectadas con VBUN y tratadas con AgNPs	97
3.4.- ME de células Vero infectadas con VBUN y tratadas con AgNPs	98
3.5.- Las AgNPs se unen a las partículas virales en células Vero	100
3.6.-A tiempos largos de tratamiento, las AgNPs se acumulan en orgánulos membranosos intracelulares	102
Discusión	107
1.- Estudio de la infección de VBUN en células Vero	109
2.- Efectos de RBV en células Vero infectadas con VBUN	114
3.- Efectos de las AgNPs en células Vero infectadas con VBUN	120
Conclusiones	127
Bibliografía	133
Anexos	155

García-Serradilla y cols., 2018

Abreviaturas

AANE Aminoácidos no esenciales

ADN Ácido desoxirribonucleico

Ag+ Iones plata

AgNPs Nanopartículas de plata (del inglés *“Silver nanoparticles”*)

AICAR 5-Aminoimidazol-4-carboxamida

ATCC (del inglés *“American type culture collection”*)

ATP Adenosín trifosfato

ARN Ácido ribonucleico

ARNc ARN complementario

ARNm ARN mensajero

ARNm sg ARNm subgenómico

ARNv ARN viral

BHK-21 Fibroblastos de riñón de hámster (del inglés *“baby hamster kidney”*).

BSA Albúmina de Suero bovino, (del inglés *“albumine serum bovine”*).

CCD Dispositivo de carga aclopada (del inglés *“charge-coupled device”*).

CCHFV Virus de la fiebre hemorrágica de Crimea Congo (del inglés *“Crimean-Congo hemorrhagic fever virus”*)

ENT-1 Transportador de nucleósidos de membrana plasmática 1

ESCRT Complejo endosomal requerido para el transporte (del inglés *“Endosomal sorting complex required for transport”*).

CHIKV Virus Chikungunya (del inglés *“Chikungunya virus”*)

CLEM Microscopía Correlativa óptica-electrónica, (del inglés *“Correlative Light and Electron Microscopy”*)

CR Complejo replicativo

3D Tres dimensiones

DAA Antivirales de acción directa (del inglés *“Direct-acting antivirals”*)

DAPI Diclorato de 4', 6-diamidino-2-fenilindol

DMEM Medio de Eagle modificado por Dulbecco (del inglés *“Dulbecco’s modified Eagle’s medium”*)

DMSO Dimetilsulfóxido

d.p.i. días post-infección

EBOV Virus del Ébola (del inglés *“Ebola virus”*)

ECL Quimioluminiscencia electrogenerada (del inglés *“Enhanced Chemiluminescence”*)

EDTA	Ácido etilendiaminotetracético (del inglés “ <i>ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate</i> ”)
FBS	Suero fetal bovino (del inglés “ <i>fetal bovine serum</i> ”)
GA	Glutaraldehído
GFP	Proteína verde fluorescente (del inglés “ <i>green fluorescent protein</i> ”).
GTP	Guanosina trifosfato
VHA	Virus de la hepatitis A
VHB	Virus de la hepatitis B
VHC	Virus de la hepatitis C
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperacín-N'-2-etanosulfónico, (del inglés “(4-(2-hydroxyethyl) -1-piperzineethanesulfonic acid)
HSV-1	Virus del herpes simple tipo 1 (del inglés “ <i>Herpes simplex virus type 1</i> ”)
h.p.i.	horas post-infección
HTNV	Virus Hantaan (del inglés “ <i>Hantaan virus</i> ”)
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IMPDH	Inosina monosfosfato dihidrogenasa (del inglés “ <i>Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase</i> ”)
IRF-3	Factor pro-apoptótico regulador del interferón 3
LACV	Virus de la encefalitis de La Crosse (del inglés “ <i>La Crosse encephalitis virus</i> ”)
LASV	Virus Lassa (del inglés “ <i>Lassa virus</i> ”)
ME	Microscopía electrónica de transmisión
MERS	Coronavirus del síndrome respiratorio de oriente medio (del inglés “ <i>Middle east respiratory syndrome</i> ”)
MF	Microscopía de fluorescencia
MO	Microscopía óptica
m.p.i.	Minutos post-infección
NLS	Señal de localización nuclear (del inglés “ <i>Nuclear localization sequence</i> ”)
NoLS	Señal de localización nucleolar (del inglés “ <i>Nucleolar localization signal</i> ”)
NP	Nucleoproteína
NPC	Complejo del poro nuclear (del inglés “ <i>Nuclear pore complex</i> ”)
OR	Órgánulo de replicación
ORF	Pauta abierta de lectura (del inglés “ <i>open reading frame</i> ”).
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Tampón fosfato salino

PFA	Paraformaldehído
RBV	Ribavirina
RDP	Ribavirin difosfato
RE	Retículo endoplasmático
RER	Retículo endoplasmático rugoso
RMP	Ribavirina monofosfato
RNPs	Ribonucleoproteínas
RNS	Especies de estrés nitrosativo (del inglés “ <i>Reactive nitrogen species</i> ”)
ROS	Especies reactivas de oxígeno (del inglés “ <i>Reactive oxygen species</i> ”)
Rpm	Revoluciones por minuto
RpRd	ARN polimerasa ARN dependiente (del inglés “ <i>RNA-dependent RNA polymerase</i> ”)
RVFV	Virus de la fiebre del Valle del Rift (del inglés “ <i>Rift Valley fever virus</i> ”)
RTP	Ribavirina trifosfato
SARS	Síndrome respiratorio agudo y severo (del inglés: “ <i>Severe acute respiratory syndrome</i> ”)
SARS-CoV	Coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave
SBV	Virus Schmallenberg
SC	Suero de cabra
SDS	Duodecil sulfato sódico
SFTVS	Virus de la fiebre severa con trombocitopenia (del inglés: “ <i>severe fever with thrombocytopenia syndrome virus</i> ”)
ssARN (+)	ARN de cadena sencilla y polaridad positiva
ssARN (-)	ARN de cadena sencilla y polaridad negativa
ssRNA (+)	ARN de cadena sencilla (del inglés “ <i>single stranded</i> ”) y polaridad positiva
TGN	Red del <i>trans</i> Golgi del inglés “ <i>trans Golgi Network</i> ”
UFP	Unidades formadoras de placa
UV	Ultra violeta
VBUN	Virus Bunyamwera
ve	Virus extracelulares
vi	Virus intracelulares
via	Virus Bunyamwera intracelular anular o de tipo I
vid	Virus Bunyamwera intracelular denso o de tipo II
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
vii	Virus intracelular inmaduro
vim	Partículas virales intracelulares maduras

VLAC Virus de La Crosse (del inglés “*La Crosse virus*”)

vRNP Ribonucleoproteína viral

WNV Virus del Nilo Occidental (del inglés: “*West Nile virus*”)

wt (del inglés “*Wild type*”)

YFV Virus de la fiebre amarilla (del inglés: “*Yellow fever virus*”)

ZIKV virus Zika (del inglés “*Zika virus*”)

Introducción

Las enfermedades infecciosas son las responsables de 15 millones de los 57 millones de muertes que se producen anualmente en una población de 7.000 millones de personas. Los virus son uno de los principales agentes causantes de estas enfermedades. El virus del Dengue infecta a unos 390 millones de personas al año, causando más de 25.000 muertes anualmente. La Hepatitis B es una de las enfermedades infecciosas más comunes en el mundo, aproximadamente 2.000 millones de personas tienen evidencia serológica de infección por el virus de la Hepatitis B y más de 250 millones de personas presentan una infección crónica. Los brotes recientes producidos por virus patógenos que afectan a humanos en los últimos años se muestran en la Tabla 1.

*Virus	Año	Número de casos	País/Territorio	Número total de territorios
Virus Zika (ZKV)	(2013-2018)	>220.000	América del Norte y del Sur, África, Asia	85
Virus de la fiebre del Valle del Rift (RVFV)	(2013-2018)	>1.000	África, Arabia Saudí y Yemen	31
Virus Ebola	(2014-2018)	>28.900	África (Liberia, Guinea, Sierra Leona, Nigeria y Mali)	6
Coronavirus del síndrome respiratorio de oriente medio (MERS)	(2012-2017)	>2.200	Oriente Medio, Norte de África, Europa, Estados Unidos y Asia	27
Coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV)	(2002-2003)	>8.000	Norteamérica, Suramérica, Suráfrica, Europa y Asia	30
Virus influenza	Anual	3 a 5 millones de casos al año	Por todo el mundo	
Virus Chikungunya (CHIKV)	(2013-2018)	> 2 millones	América del Norte y del Sur, África, Asia, Europa, el Subcontinente Indio y las islas del Pacífico en Oceanía	112
Virus Dengue (DENV)	Anual	390 millones de infecciones de Dengue al año	África, América del Norte y del Sur, el Mediterráneo Oriental, Sur-Este de Asia y el Pacífico Occidental	111
Virus de la fiebre amarilla (YFV)	(2013-2018)	>15.000	33 países en África y 11 países en Suramérica	44
Virus del Nilo Occidental (WNV)	(2013-2018)	>12.000 Desde 2013: Alrededor de 2.500 casos por año	América del Norte y del Sur, Europa, África, Oriente Medio, el Oeste Asiático y Oceanía	83
Virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo (CCHFV)	(2000-2015)	>1.000	África, Asia, Europa Occidental y Oriental y el Centro Asiático	42
Virus de la fiebre severa con trombocitopenia (SFTSV)	(2009-2016)	>1.300 Desde 2016: >1.500 casos por año	Corea del Sur, Japón, China y Emiratos Árabes Unidos	4

Tabla 1. Brotes recientes producidos por virus patógenos que afectan a humanos.

(Adaptado de García-Serradilla M y cols., 2019). *En paréntesis, siglas en inglés de los nombres de los virus.

Fuentes:

Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades (ECDC). (<https://ecdc.europa.eu/en/threats-and-outbreaks>).

Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades en Estados Unidos (CDC). (<https://www.cdc.gov/outbreaks/index.html>).

Centro Chino para la Prevención y el Control de las Enfermedades (China CDC).

(http://www.chinacdc.cn/en/aboutus/orc_9362/201810/t20181008_194504.html)

Organización Mundial de la Salud (en inglés WHO). (<https://www.who.int/csr/don/en/>).

1.- Arbovirus.

El cambio climático, junto con los movimientos poblacionales, está favoreciendo la diseminación de insectos y de mosquitos transmisores de virus patógenos, conocidos como arbovirus, término proveniente del inglés “*arthropod borne virus*” (virus transmitidos por artrópodos). En la actualidad hay identificados unos 500 arbovirus. La mayoría de géneros de arbovirus pertenecen comúnmente a virus ARN y muchos de ellos están incluidos dentro de las familias *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae* y el orden Bunyavirales (Karabastos, 1985; Blair y cols., 2000; Cleton y cols., 2012; Maes P y cols., 2018). Muchos de los virus de estas familias se han calificado como virus emergentes (Soldan y cols., 2005). Los principales vectores son dípteros y garrapatas, y los principales reservorios aves y roedores (Ewald 1994a,b; Kuno y Chang 2005; Lambrechts L y cols., 2010; Conway MJ y cols., 2014). Los arbovirus están distribuidos globalmente, aunque la mayoría se encuentran en regiones tropicales y subtropicales. En las últimas décadas se han esparcido por todo el mundo, desde las zonas de origen a zonas donde no se habían encontrado con anterioridad (Kuno G y Chang GJ, 2005; Weaver y Reisen, 2010; Kraemer MUG y cols., 2019). Las causas que han provocado su diseminación son múltiples y tienen que ver con la globalización, debido al incremento de la movilidad poblacional y del comercio (Gould E y cols., 2017) y el cambio climático (Gould E y Higgs S, 2009), ya que el aumento de las temperaturas está favoreciendo que los vectores puedan expandirse a nuevas zonas (Jones y cols., 2008; Tabachnick WJ 2016a,b; Lorenz y cols., 2017). La incursión humana en nuevos ecosistemas y la modificación de los hábitats son también responsables de la expansión de los vectores (Harvell y cols., 2002; Elliott, 2009).

Estos virus son causantes de enfermedades que afectan severamente la salud de humanos, animales y plantas. No existen vacunas o tratamientos eficaces para la mayoría de los arbovirus que producen enfermedades, con la excepción del virus de la fiebre amarilla (García-Serradilla M y cols., 2019).

2.-Vectores artrópodos.

Una de las consecuencias más importantes y de gravedad del cambio climático, es el incremento de temperaturas que ha favorecido la diseminación de numerosos vectores de arbovirus en numerosos países. Dentro del orden Bunyavirales, entre los principales vectores implicados en su propagación están las garrapatas del género *Hyalomma* y los mosquitos de los géneros *Aedes*, *Culex* y *Anopheles* (Maltezou y Papa, 2010). Una vez introducidos los vectores en un nuevo ambiente, la aparición de las enfermedades que transmiten es sólo cuestión de tiempo (Mackenzie y cols., 2004). Uno de los géneros de mosquito que más se ha extendido a nivel

global es el género *Aedes* y dentro de éste principalmente las especies *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* (Carlson y cols., 2016; Hafiz y cols., 2016; Kraemer MUG y cols., 2019). En la actualidad, los estudios de los hábitats idóneos indican que de los 250 países/territorios considerados, 215 (86%) son potencialmente adecuados para la existencia y desarrollo de *Aedes aegypti* y/o *Aedes albopictus* (Leta S y cols., 2018). *Aedes albopictus* es el vector más importante para la transmisión de los bunyavirus, así como para otros arbovirus. Debido a la coloración de su abdomen en forma rayas se le denomina comúnmente mosquito tigre. Es una especie invasora originaria del sudeste asiático, que desde finales de la década de los 70 se ha ido diseminando por África, América, Europa y posteriormente por la zona del Pacífico. En la actualidad se encuentra presente en todos los continentes del planeta excepto en la Antártida. En zonas endémicas es transmisor del Dengue (Jansen y Beebe, 2010), la fiebre amarilla (Aitken y cols., 1979), la encefalitis por WNV (Gratz, 2004), la fiebre chikungunya (Burt y cols., 2012) y el virus Zika (Thangamani y cols., 2016).

En España su presencia fue notificada por primera vez en 2004 en San Cugat del Vallés (Cataluña). Desde entonces se ha ido diseminando por toda la cuenca mediterránea y en poblaciones circundantes (Aranda y cols., 2006; Bravo-Barriga D y cols., 2019). Durante 2017 se hicieron capturas específicas de *Aedes albopictus* para la vigilancia de su expansión y comportamiento en 122 municipios presentes en Andalucía, Aragón, comunidad de Murcia, Comunidad Valenciana, Islas Baleares y País Vasco y se ha confirmado la presencia del mosquito tigre se muestra en la Figura I-1.

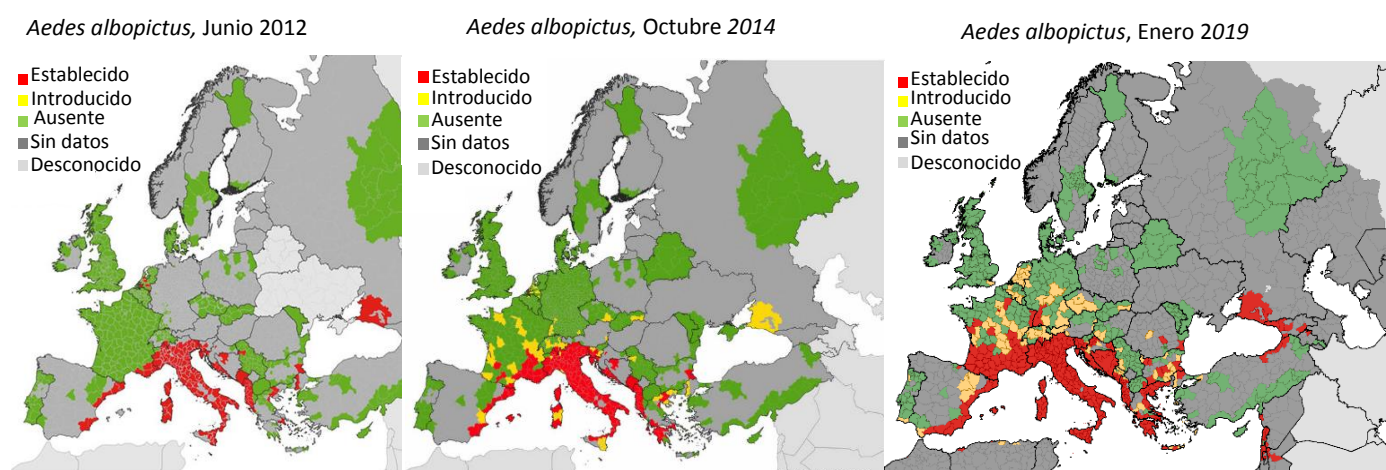
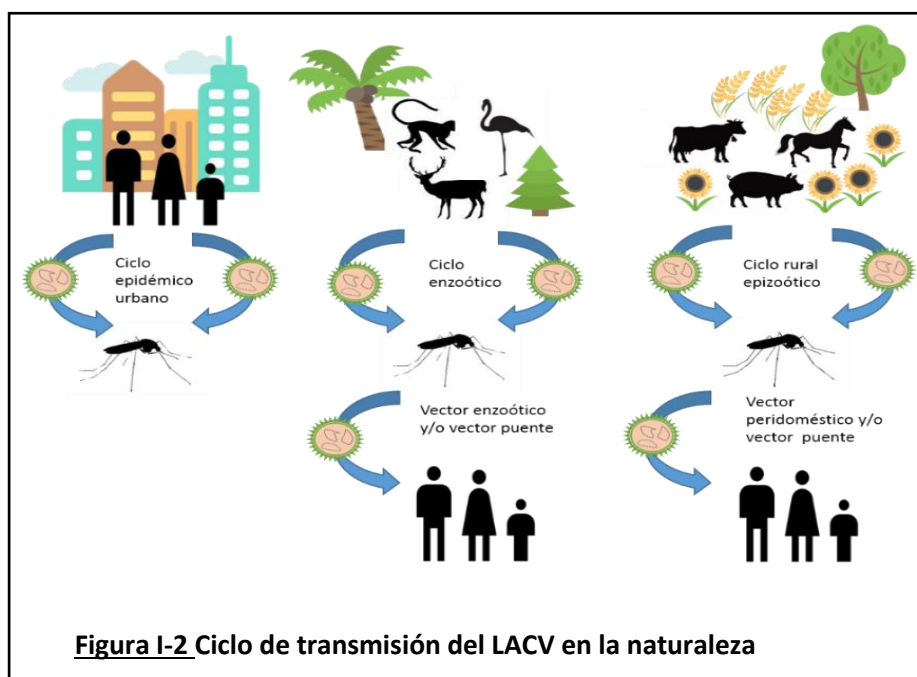


Figura I-1 Expansión y distribución actual de *Aedes albopictus*.

Los mapas muestran como *Aedes albopictus* se ha extendido por Europa en los últimos 7 años, debido principalmente al cambio climático y al movimiento poblacional. Esta expansión ha sido más intensa en el área mediterránea. Mapas obtenidos del Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC).

La infección en el insecto vector ocurre de forma diferente a la del hospedador vertebrado, desencadenando en una infección persistente tras la fase aguda (López-Montero y Risco, 2011). En los vectores artrópodos, los bunyavirus se multiplican y dispersan tanto transovaricamente (transmisión vertical) (Watts y cols., 1973; Tesh y Modi, 1987) como de forma venérea (transmisión horizontal) (Thompson y Beaty, 1977).

El ciclo natural de los Orthobunyavirus, usando como modelo el ciclo del LACV se muestra en la Figura I-2.



3.- Orden Bunyavirales.

En 1975 se estableció formalmente la familia *Bunyaviridae*, la cual, estaba constituida por cinco géneros. En el año 2017 se definió una nueva taxonomía y se creó el orden Bunyavirales. Este nuevo orden se constituyó con la finalidad de incluir todos aquellos virus que mantenían relación en cuanto a sus genomas ARN, siendo clasificados en nueve familias (Maes P y cols., 2018). En octubre de 2018, el orden Bunyavirales se modificó mediante la inclusión de la familia *Arenaviridae*, la abolición de tres familias, la creación de tres nuevas familias, 19 nuevos géneros y 14 nuevas especies, y el cambio de nombre de tres géneros y 22 especies (Maes P y cols., 2019). Actualmente el orden Bunyavirales está constituido por 10 familias (*Arenaviridae*, *Cruliviridae*, *Fimoviridae*, *Hantaviridae*, *Myopoviridae*, *Nairoviridae*, *Peribunyaviridae*, *Phasmaviridae*, *Phenuiviridae*, *Wupedeviridae*), 35 géneros y más de 500 especies descritas.

En este orden se incluyen virus que poseen un genoma segmentado formado por ácido ribonucleico de cadena sencilla (ssRNA, del inglés “*Single Stranded Ribonucleic Acid*”) y polaridad negativa. La mayor parte de los virus de este orden son Arbovirus, con la excepción de la familia *Hantaviridae*, cuyos virus son transmitidos principalmente por contacto con animales infectados (excrementos, saliva y orina) (Vapalahti y cols., 2003; Lednicky, 2003; Hinson y cols., 2004). El orden Bunyavirales contiene más de 500 virus, muchos de los cuales son capaces de infectar una gran cantidad de animales y plantas. Algunos de estos virus también infectan a humanos, causando enfermedades tanto leves, como el síndrome febril auto-limitado, como severas, provocando cuadros neurológicos graves (meningitis o meningoencefalitis) o fiebres hemorrágicas, muchas de ellas mortales (Tsai y Chandler, 2003; Yandoko y cols., 2007). Muchos de los virus de este orden están clasificados como patógenos emergentes debido a su incidencia en nuevos hospedadores y al incremento de su distribución geográfica (Walter and Barr, 2011; Sutherland L y cols., 2013).

3.1- Virus Bunyamwera.

El virus Bunyamwera (VBUN) fue aislado de mosquitos del género *Aedes* en el bosque Semliki (Uganda) en 1943 (Smithburn y cols., 1946). Miembro de la familia *Peribunyaviridae*, el VBUN pertenece al género *Orthobunyavirus*, el cual comprende 175 virus, lo que le convierte en el género más grande dentro del orden Bunyavirales (Maes P y cols., 2019). El VBUN es el prototipo del género *Orthobunyavirus* y en general de todos los bunyavirus (Eifan y Elliot, 2009). Los *Orthobunyavirus* son arbovirus transmitidos por la picadura de diferentes especies de mosquito, en concreto los pertenecientes a la familia *Culicidae* y a los géneros *Aedes*, *Culex* o *Anopheles*. Los hospedadores son pequeños mamíferos silvestres como ardillas u otros roedores (Beaty and Bishop, 1988). El VBUN no produce efecto citopático en el mosquito vector, donde causa una infección persistente (López-Montero y Risco, 2011). En humanos, el VBUN no causa una enfermedad grave, produciendo tan sólo leves febrículas, aunque virus de la misma familia sí son patógenos importantes (Sidwell y Smee, 2003; Smee y Sidwell, 2003).

3.2.- Morfología y genoma viral.

El VBUN es un virus con envuelta lipídica en la que las glicoproteínas Gc y Gn interaccionan y construyen regiones de simetría icosaédrica (Overby y cols., 2008). La partícula viral tiene un diámetro de entre 80 y 120 nm con espículas o *spikes* formadas por las glicoproteínas (Novoa y cols., 2005b; Shi y cols., 2007). El VBUN al igual que todos los virus del orden Bunyavirales posee un genoma constituido por tres segmentos de ssARN (-) denominados: L (*large*), M (*medium*) y S (*small*), abreviaturas del inglés que hacen referencia a su longitud (Figura I-3 A). Los tres

segmentos génicos del VBUN poseen extremos 3' y 5' complementarios, lo que les permite superponer las estructuras generando una estructura cerrada de forma no covalente con una organización circular (Schmaljohn y Hooper, 2007).

En la Figura I-3 B se muestra la estructura de la partícula viral con sus componentes y la organización del genoma viral con las proteínas que codifica cada segmento.

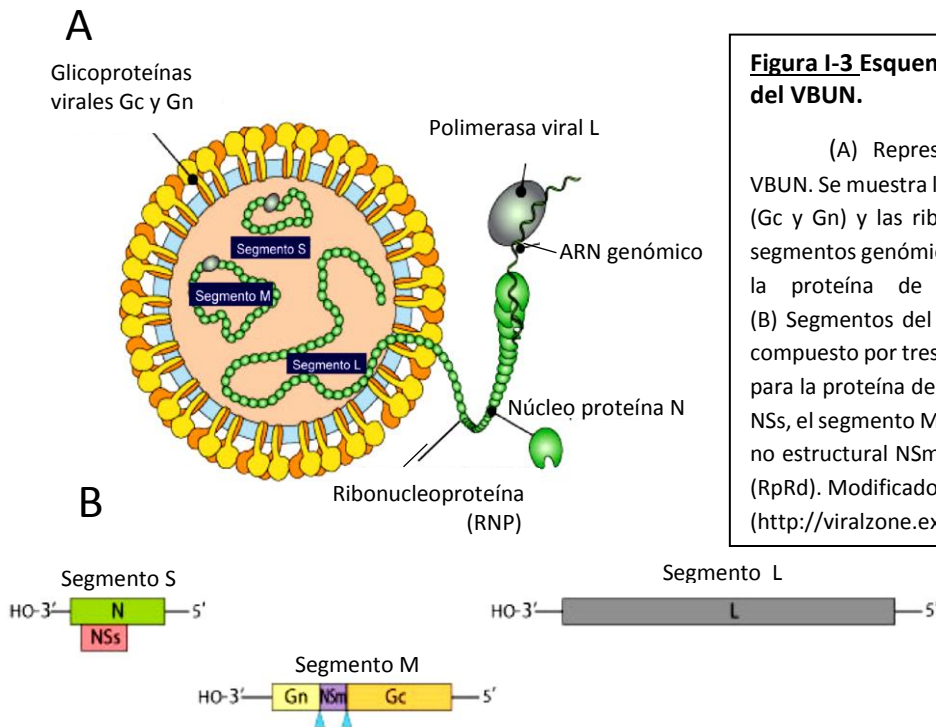


Figura I-3 Esquema de la estructura, genoma y proteínas del VBUN.

(A) Representación esquemática de la estructura del VBUN. Se muestra la envuelta lipídica con las glicoproteínas virales (Gc y Gn) y las ribonucleoproteínas virales (vRNPs) con los tres segmentos genómicos S, M y L, la polimerasa (L) y las moléculas de la proteína de la nucleocápsida o nucleoproteína (N). (B) Segmentos del genoma del VBUN. El genoma del VBUN está compuesto por tres segmentos de ssARN (-). El segmento S codifica para la proteína de la nucleocápsida N y la proteína no estructural NSs, el segmento M codifica las glicoproteínas Gn y Gc y la proteína no estructural NSm, y el segmento L codifica la polimerasa viral L (RpRd). Modificado de: (http://viralzone.expasy.org/all_by_species/82.html).

3.3.- Proteínas virales.

-Polimerasa viral L.

El segmento L codifica para la polimerasa viral o proteína L, que es la ARN polimerasa dependiente de ARN (*"RNA polymerase RNA dependent"* RpRd). Su tamaño varía desde 250kDa en Orthobunyavirus, Hantavirus y Phlebovirus hasta los 450 kDa en Nairovirus. L es responsable de la replicación y transcripción del genoma viral y utiliza ARN antígenómico como intermediario (Flick K y cols 2001; Shi X y Elliott, 2009). Para que pueda funcionar como molde para la transcripción, el ARN debe interaccionar con la proteína N para formar las vRNPs que poseen una estructura helicoidal. Por lo tanto, sólo las vRNPs, no el ARN desnudo, funcionan como molde para la transcripción viral (Dunn y cols., 1995). Durante la transcripción, los segmentos de VBUN se transcriben a mensajeros virales por la polimerasa viral L con la ayuda del mecanismo de *"cap-snatching"*. Este mecanismo consiste en el secuestro de los cebadores celulares correspondientes a los extremos "cap" 5' de ARN mensajeros celulares. Los cebadores

se generan gracias a la actividad endonucleasa de L (Jin y Elliott, 1991, 1992 y 1993). Los ARNm celulares secuestrados se concentran en el citoplasma de las células infectadas (Shi X y Elliott, 2009).

-Nucleoproteína N.

La nucleoproteína N es codificada por el segmento S al igual que la proteína no estructural NSs. En Orthobunyavirus N posee un tamaño de 23 kDa llegando hasta 50 kDa en otros géneros de la familia como Hantavirus y Nairovirus (Schmaljohn y cols., 2001; Nichol y cols., 2005; Elliot, 2009). N es la proteína más abundante en las células infectadas y desempeña varios papeles importantes durante la replicación viral. Su función principal es formar las vRNPs, mediante la unión al ARN. De esta manera encapsida el genoma viral, lo que le confiere protección de la detección y degradación por parte del sistema inmune del huésped y de las nucleasas (Eifan y Elliot, 2009). N también es capaz de interaccionar consigo misma formando oligómeros, con la polimerasa viral L, y con la región carboxi-terminal de las glicoproteínas virales, estabilizando la estructura del virión. Otra función que N lleva a cabo es la regulación de la actividad de la polimerasa viral (Shi X y cols., 2005).

-Proteína no estructural NSs.

El segmento S de VBUN aparte de codificar la nucleoproteína N codifica la proteína no estructural NSs a partir de una pauta abierta de lectura ("*open Reading frame*", ORF) solapante, como se muestra en la Figura I-3 B. NSs tiene un tamaño aproximado de 13 kDa (Elliot, 1990) y en células infectadas presenta una distribución tanto citoplasmática como nuclear (Weber y cols., 2001; Bridgen y cols., 2001; Thomas y cols., 2004). NSs no es esencial para la replicación del virus, sino que funciona como proteína accesoria que actúa como factor de virulencia capaz de bloquear el sistema inmune innato del hospedador, lo que permite al virus evadir la respuesta del interferón (Bridgen y cols., 2001; Thomas y cols., 2004; Barry G y cols., 2014; Hong Y y cols., 2019). En VBUN este proceso se produce inhibiendo la transcripción del ARNm celular por medio del bloqueo de la ARN polimerasa II celular, en concreto al interaccionar con la proteína mediadora MED8 (Léonard VH y cols., 2006). Aparte de producir el "*shut off*" en la síntesis de proteínas en la célula huésped y prevenir así la activación de las respuestas inmunes innatas, NSs tiene también un papel importante siendo capaz de inducir apoptosis celular, como es en el caso de CCHFV (Barnwal B y cols., 2016) del virus VLAC (Pekosz A y cols., 1996), de hantavirus (Kang y cols., 1999; Kohl y cols., 2003) o del virus Schmallenberg (Barry G y cols., 2014).

-Proteínas Gc y Gn.

El segmento M codifica para las glicoproteínas transmembranales Gc y Gn y la proteína no estructural NSm. En VBUN el tamaño de Gn es de 32 kDa y el de Gc 110 kDa (Pollitt y cols., 2005).

La unión de Gn y Gc a factores de la superficie celular promueve la adhesión y entrada del virus a la célula. Los receptores utilizados por los bunyavirus están en su mayoría sin identificar (Spiegel M y cols., 2016). Los dominios citoplasmáticos de ambas glicoproteínas tienen un papel importante en la fusión de la membrana del virus con la del endosoma durante su entrada en la célula, pero aún se desconoce qué función podría tener cada glicoproteína en los eventos tempranos de la infección viral (Shi y cols., 2010; Shi y cols., 2016). Se sabe que Gc reconoce el receptor en células de mamífero y que Gn reconoce el receptor en células de artrópodo. En células infectadas la distribución de Gc y Gn es citoplasmática, concentrándose en el aparato de Golgi, que es el orgánulo de replicación (OR) del genoma viral y el lugar de ensamblaje del virus (Nakitare y Elliot, 1993; Lappin y cols., 1994; Salanueva y cols., 2003). Ambas proteínas son glicosiladas en el Golgi (Novoa y cols., 2005b) y poseen tres sitios potenciales de glicosilación, un sitio en Gn y dos en Gc (Shi y cols., 2005; Shi y cols., 2016). El heterodímero Gn-Gc desempeña funciones claves en la mediación del ensamblaje del virus (Schmaljohn y Nichol, 2007). Los heterodímeros de Gn-Gc son retenidos en el Golgi, donde se asocian a las vRNPs para mediar la gemación o "*budding*" de las partículas virales. En el caso de VBUN, la señal de retención del Golgi para el heterodímero Gn-Gc se encuentra en Gn, concretamente en el dominio transmembrana (Shi y Elliott, 2004; Walter CT y Barr JN, 2011; Walter CT y cols., 2011).

-Proteína no estructural NSm.

El segmento M también codifica para la proteína NSm que tiene un peso molecular de 16-18 kDa (Elliott, 1990). NSm posee tres dominios transmembrana (Nakitare y Elliott, 1993). NSm se acumula en el aparato de Golgi e interacciona con la proteína N y con las glicoproteínas virales durante el ensamblaje del virus (Shi y cols., 2006; Fontana y cols., 2008). Los datos obtenidos en nuestro laboratorio, sugieren que NSm podría estar actuando como una proteína de andamiaje, que facilitaría el ensamblaje del virus inmaduro siendo degradada posteriormente de modo que ya no se encuentra en los viriones maduros (Fontana y cols., 2008).

3.4.- Ciclo de replicación viral.

Durante el proceso de entrada, la fusión de la partícula viral a la membrana celular es mediada por Gc, que es una proteína de fusión Tipo II (Hover S y cols., 2018). La acidificación es necesaria para la fusión de los bunyavirus a la membrana del endosoma y para que se produzca la liberación de las vRNPs, pero ésta no es siempre suficiente (Albornoz A y cols., 2016). La mayoría de las proteínas de fusión Tipo I y Tipo II estudiadas hasta la fecha requieren de un evento de escisión proteolítica para que se produzca una fusión competente (Harrison SC, 2015). En la Figura I-4 se muestra un esquema del ciclo de replicación del VBUN.

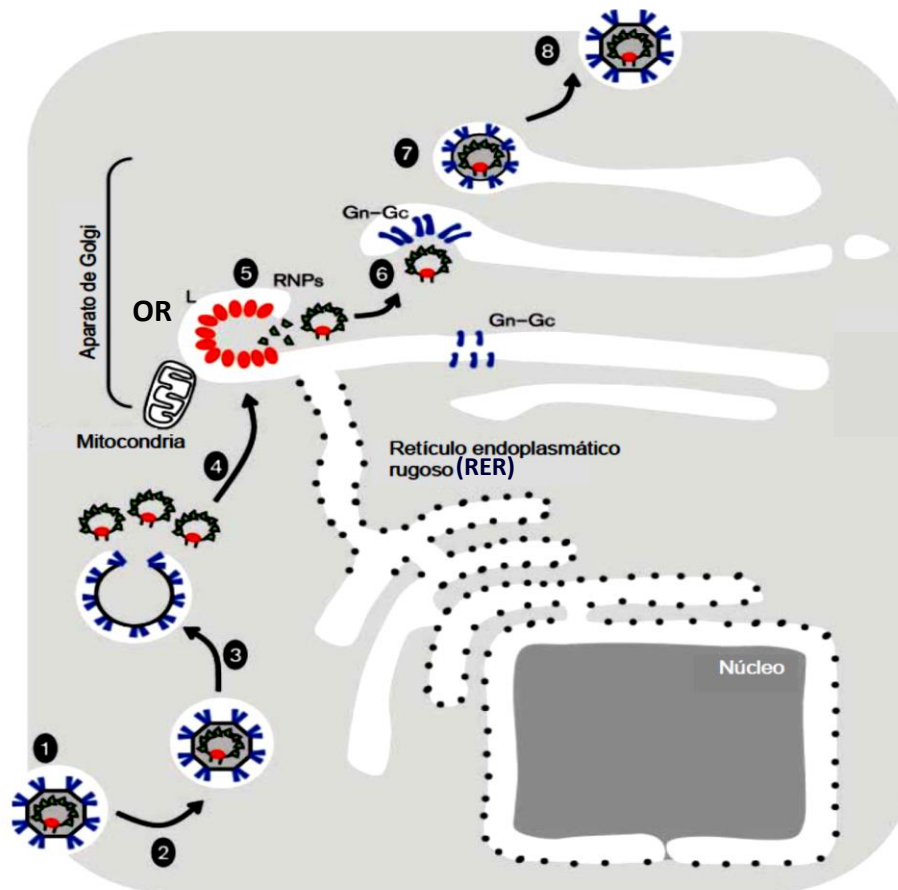


Figura I-4. Modelo de la entrada, replicación, ensamblaje y salida del VBUN.

La entrada se produce principalmente por endocitosis mediada por receptor (1), después el virus pasa a través de endosomas tempranos y tardíos (2), a continuación, se produce la liberación de las vRNPs al citoplasma por acidificación del pH del endosoma tardío (3) posteriormente las vRNPs se dirigen al aparato de Golgi (4). El orgánulo de replicación (OR) (5) contiene macromoléculas celulares y virales concentradas en membranas del Golgi, se encuentra conectado a mitocondrias y a RER. En el dominio globular del OR, se concentra la polimerasa viral L (óvalos de color rojo). (6) Las vRNPs recién sintetizadas se asocian con los heterodímeros formados por las glicoproteínas virales Gn y Gc (en azul) que se acumulan en el Golgi. Los heterodímeros Gn-Gc son modificados por las enzimas de glicosilación en el *trans*-Golgi (7), produciéndose los cambios conformacionales asociados a la maduración de las partículas virales. Los virus son transportados en vesículas de secreción hasta la membrana plasmática para ser liberados (8). Modificado de Walter y Barr, 2011.

Los bunyavirus usan un gran número de receptores que les permiten infectar un gran número de especies y de diferentes tejidos, sin embargo, tanto los receptores como las vías y los factores celulares requeridos en la entrada de los bunyavirus permanecen en su mayoría sin identificar o pobremente caracterizados. Tan sólo unos pocos receptores han sido documentados en humanos y vertebrados y todavía ninguno en los vectores artrópodos. Aunque los receptores aún no están identificados, parece que en este proceso inicial podrían estar implicadas una o más moléculas de ubiquitina. Una vez el virus se ha adherido a la superficie celular es internalizado por endocitosis (Lozach, PY y cols., 2011; Cifuentes-Munoz N y cols., 2014). La endocitosis dependiente de clatrina ha sido observada en los virus de las familias *Antaviridae*,

Nairoviridae y *Peribunyaviridae* (Lozach, PY y cols., 2011; Cifuentes-Munoz N y cols., 2014). Estudios recientes han mostrado que para la entrada en la célula huésped de ciertos virus, como los hantavirus, es necesaria una concentración alta de colesterol en las membranas diana. En otros estudios se ha mostrado que la depleción de colesterol reduce la infectividad en VBUN (Charlton FW y cols., 2019). También se ha visto cómo VBUN requiere de la actividad de los canales de potasio (K⁺) celular para producir una infección productiva (Albornoz A y cols., 2016).

Una vez liberado el genoma viral al citosol, se produce la transcripción de los segmentos del genoma por la acción de la proteína L, produciendo los ARNm. En esta primera etapa de transcripción, se usan como cebadores oligonucleótidos presentes en el extremo 5' de ARNm celulares, generados por la actividad endonucleasa de la proteína L (Jin y Elliott, 1993). Los ARNm de los segmentos L y S son traducidos por los ribosomas libres presentes en el citoplasma produciendo la síntesis de las proteínas virales, el segmento M es traducido en ribosomas unidos al RE. Una vez que se han sintetizado las glicoproteínas Gc y Gn, éstas son transportadas a las membranas del Golgi (Lappin y cols., 1994).

Para la replicación de los genomas ARN de polaridad negativa, se necesita un ARN complementario de polaridad positiva, el antígeno. Esta molécula se diferencia de los ARNm en que no lleva la extensión del cebador en posición 5' y que el final en 3' se extiende completamente hasta el final del extremo 5' del molde de ARN genómico. Estos procesos de transcripción y replicación se muestran en la Figura I-5.

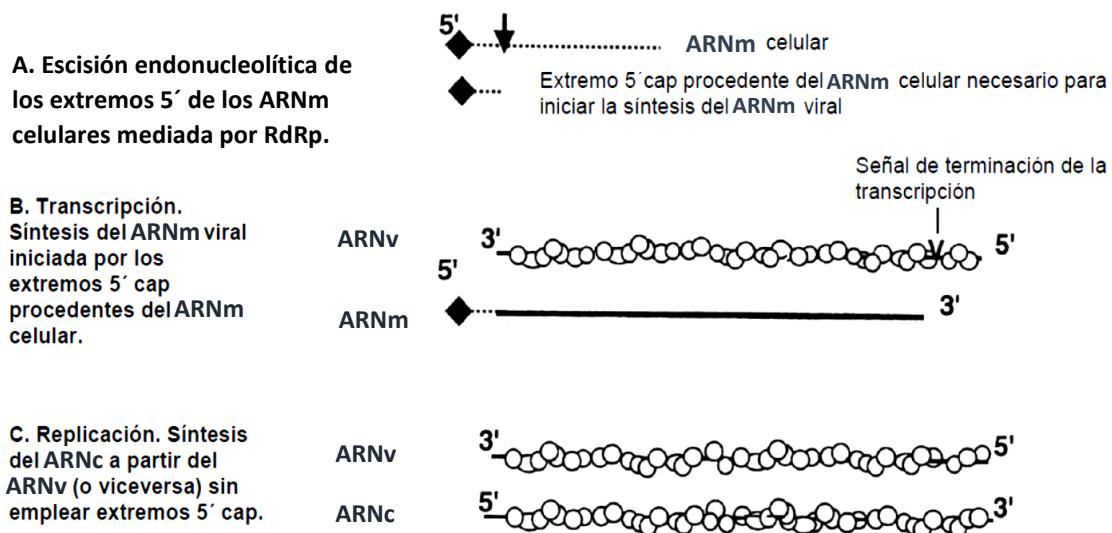


Figura I-5. Transcripción y replicación de los virus del género *Orthobunyavirus*.

(A) La transcripción del ARNm viral está precedida por la escisión endonucleolítica de los extremos 5' de los ARNm celulares. (B) Los extremos procesados en (A) sirven como iniciadores de la síntesis del ARNm viral. Existe una señal de terminación de la transcripción (V) cerca del extremo 5' del ARNm viral. (C) La replicación del ARNm para generar ARNc (o del ARNc a ARNm) es independiente del extremo 5' cap procedente del ARNm celular. Modificado de Schmaljohn y Nichol, (2007).

Para la replicación de VBUN sólo son necesarias las proteínas L y N (Dunn y cols., 1995). Se desconoce cómo L es capaz de realizar el paso de transcripción a replicación, pero como ocurre con otros virus ARN de polaridad negativa, la cantidad de proteína N sintetizada puede ser clave para que se produzca dicho cambio. La transición de transcripción a replicación es provocada por dos eventos clave: el requerimiento de un cebador para la iniciación y el reconocimiento de una señal de terminación en el ARNm. Los distintos modelos de producción de ARN podrían deberse a diferentes formas de la proteína L, debido a la asociación de ésta con proteínas celulares diferentes.

3.5.- Ensamblaje y morfogénesis viral. La Factoría viral.

Las factorías virales son estructuras que los virus construyen en la célula huésped, para compartimentalizar distintas etapas de su ciclo vital. Están constituidas por componentes celulares y virales, que trabajan en la replicación del genoma y la morfogénesis de nuevas partículas virales. Son estructuras tempranas, formadas en el inicio de la infección (Novoa y cols., 2005a). Las factorías virales también proporcionan un entorno protegido dentro de la célula, donde la maquinaria replicativa viral se encuentra aislada del sistema inmune celular. Por lo general, las factorías son estructuras dinámicas que sufren variaciones en tamaño, número y estructura durante el transcurso de la infección (Eichwald y cols., 2004).

La factoría viral que forma VBUN ha sido ampliamente estudiada con anterioridad en nuestro laboratorio (Salanueva y cols., 2003; Novoa y cols., 2005b; Fontana y cols., 2008; Fernández de Castro y cols., 2014). En estos estudios se ha mostrado de una forma muy detallada cuáles son los elementos que constituyen la factoría de VBUN en diferentes modelos celulares (BHK-21, MRC5, Hep2 y Vero). VBUN ensambla la factoría en el aparato Golgi que se rodea de mitocondrias y cisternas del RER. En células BHK-21, el Golgi pasa de tener una distribución perinuclear en células no infectadas a encontrarse agrupado a un lado del núcleo en células infectadas (Fontana y cols., 2008), mientras que en células Vero el Golgi se fragmenta y dispersa con la infección (Salanueva y cols., 2003). En el Golgi se ensamblan los orgánulos de replicación (ORs), estructuras que contienen un dominio globular o esférula y un dominio tubular. La polimerasa L se concentra en los dominios globulares de los OR (Figura I-4 A) que albergan el complejo replicativo (CR) del virus (Fontana y cols., 2008) (Figura I-6 A). En el dominio tubular de los ORs (Figura I-6 B y C) se ha encontrado la proteína viral NSm, que también se encuentra en los virus intracelulares inmaduros, pero no en los viriones maduros, lo cual sugiere que podría ser una proteína de andamiaje como se ha mencionado anteriormente. En un estudio de

proteómica de los OR purificados se encontraron también proteínas celulares como actina, tubulina, proteínas ribosomales, el factor de elongación II de la traducción en eucariotas, la proteína del retinoblastoma y la miosina-9 (Fontana y cols., 2008). Estudios de ME tridimensional sugieren que los dominios tubulares de los ORs podrían estar actuando como estructuras de comunicación entre los distintos elementos de la factoría viral (Fontana y cols., 2008).

Mediante Microscopía Electrónica (ME) se describieron dos intermediarios en el ensamblaje de las partículas virales: el virus intracelular anular (via) o de tipo I y el virus intracelular denso (vid) o de tipo II (Figura I-6 D), nombres que hacen referencia a las densidades electrónicas que muestran en secciones ultrafinas estudiadas mediante ME (Salanueva y cols., 2003). Se encontraron dos etapas clave en el proceso de maduración de los virus. El primero tiene lugar en las membranas del *trans*-Golgi donde los via maduran para transformarse en los vid, gracias a la adquisición de azúcares complejos por N-glicosidación de las glicoproteínas virales. El segundo cambio estructural se produce durante la salida de los virus de la célula, momento en el que se produce el ensamblaje de las espículas de la envuelta características de los virus extracelulares infectivos (Novoa y cols., 2005a).

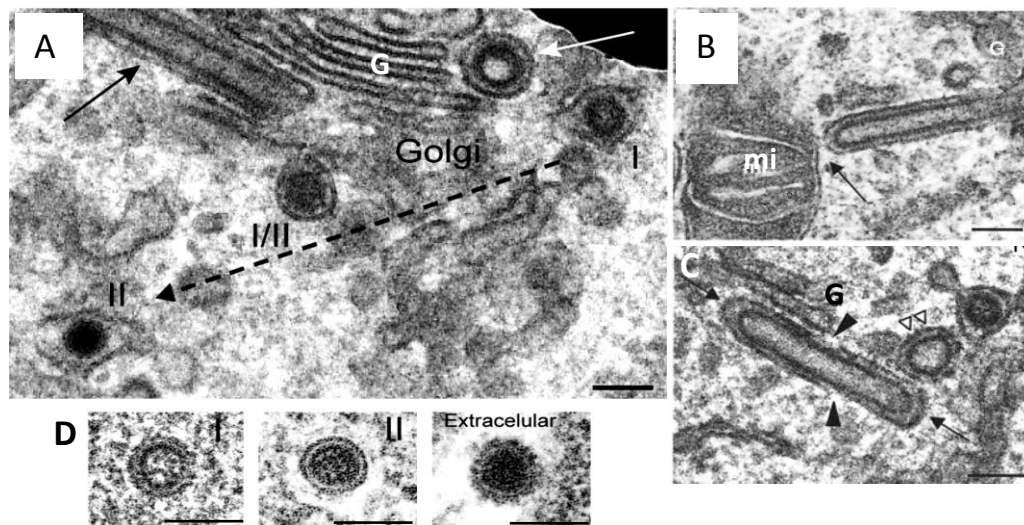


Figura I-6. ME de la factoría viral y diferentes estructuras virales producidas durante la infección de VBUN.

(A) En el Golgi (G) se ensambla el Orgánulo de Replicación (OR) que se compone de un dominio globular (flecha blanca) y uno tubular (flecha negra); también se pueden apreciar virus intracelulares (I, via y II, vid). (B) Los tubos virales contactan (flecha) con las mitocondrias (mi). (C) Tubo viral (flecha) con aperturas al citoplasma (puntas de flecha negras) (D) I virus intracelular anular (via), II virus intracelular denso (vid) y virus extracelular. (A) Fontana y cols., (2008); (B-D) Salanueva y cols., (2003). Barras 100 nm.

En la factoría creada por VBUN se produce un reclutamiento importante de mitocondrias (Novoa y cols., 2005a,b). Estas podrían tener diversas funciones, algunas de las cuales serían utilizadas por el virus, entre otras el virus podría estar utilizando el metabolismo de lípidos, el aporte energético necesario para la replicación viral, la regulación de la homeostásis del calcio en la célula huésped, o bien causar estrés oxidativo en la célula huésped, regulación de procesos apoptóticos y bloqueo de la actividad antiviral mitocondrial (Anand SK y Tikoo SK 2013; Khan M y cols., 2015; Reshi L y cols., 2018). En el modelo propuesto por nuestro laboratorio, las vRNPs son transportadas por el complejo actina-miosina desde los sitios de replicación donde están los CRs albergados en los dominios globulares, hasta los sitios de ensamblaje en las membranas del Golgi modificadas por la inserción de Gn y Gc, promoviendo la formación de las partículas virales mediante gemación o “*budding*” (Fontana y cols., 2008). Posteriormente las partículas virales son transportadas a la superficie celular en vesículas de secreción. La Figura I-7 muestra el modelo actual de la estructura y funcionamiento de los distintos elementos de la factoría de VBUN.

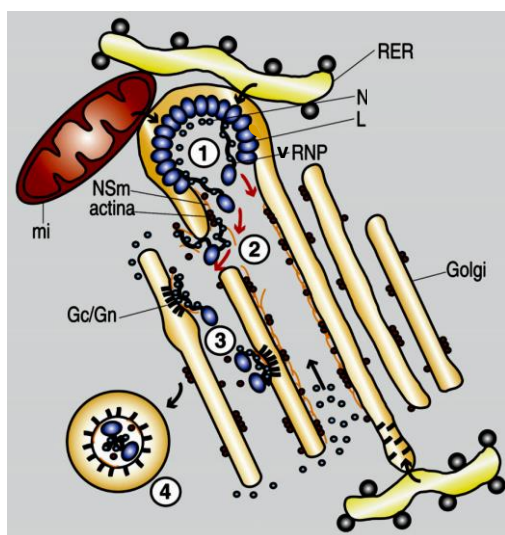


Figura I-7. Modelo del funcionamiento de los ORs en la factoría de VBUN en células de mamífero.

- 1) Síntesis del ARN viral y formación de las vRNPs en las esférulas o dominios globulares de los ORs.
- 2) Transporte de las vRNPs a los sitios de ensamblaje. Este transporte podría estar mediado por el complejo actina-miosina.
- 3) Formación de los arcos de maduración que generarán los nuevos virus.
- 4) Partícula viral lista para los procesos de maduración y secreción.

L, polimerasa viral; vRNP, ribonucleoproteína viral; N, nucleocápsida; Gc/Gn, glicoproteínas virales; NSm, proteína no estructural codificada por el segmento M; RER, retículo endoplasmático rugoso; mi, mitocondria. Modificado de Fontana y cols., 2008.

4.-El núcleo y nucléolo celular en las infecciones virales.

Muchos virus ADN o ARN, con y sin envuelta, interrumpen o explotan las rutas de tráfico núcleo-citoplásmico de la célula huésped para acceder a funciones nucleares (Walker y Ghildyal, 2017). La interacción con las funciones nucleares es por tanto común en numerosas familias de virus. El mecanismo de entrada de virus o complejos macromoleculares virales en el núcleo puede seguir diferentes estrategias. El retrovirus de la leucemia murina accede al núcleo durante la mitosis cuando la envoltura nuclear se encuentra temporalmente desmontada. En el caso del parvovirus, el virus interrumpe transitoriamente la envuelta nuclear y la lámina nuclear.

El VIH-1 y el virus de la gripe A tienen NLS (*"nuclear localization signal"*) en algunas de sus proteínas y usan el poro nuclear para introducir sus macromoléculas en el núcleo usando la maquinaria de transporte del NPC (*"nuclear pore complex"*). Los Herpesvirus introducen su cápside utilizando importinas para atravesar el complejo del poro nuclear. El virus de la hepatitis B y algunos baculovirus son lo suficientemente pequeños como para cruzar el complejo del poro nuclear. La mayoría de virus ARN no requieren internalizar su genoma viral dentro del núcleo para replicarse, pero para su replicación pueden necesitar proteínas de unión al ARN que se encuentran en el núcleo. La entrada de proteínas virales en el núcleo también permite la interrupción de la transcripción de la célula huésped y de las respuestas antivirales innatas (Vincent HJ y cols., 2006; Flather D y Semler BL, 2015; Ly HJ y Ikegami T, 2016).

- Nucléolo y virus.

En los últimos años, la idea de que el nucléolo era una simple factoría de ribosomas ha cambiado. En la actualidad, el nucléolo se conoce como una estructura altamente dinámica y multifuncional que participa en la biogénesis de múltiples ribonucleoproteínas, en el control del ciclo celular, supresión de tumores, apoptosis, replicación y reparación del ADN y señalización de estrés (Boulon S y cols., 2010). El nucléolo juega un papel importante en la interacción entre los virus y las células del hospedador. Algunos virus muestran asociaciones con nucléolos (Matthews y cols., 2011). Los virus expresan proteínas que usan como blanco el nucléolo y modifican las funciones nucleolares. Hay virus que reclutan/explotan componentes nucleares y nucleolares que juegan un papel importante en el ciclo vital del virus. Ciertos virus que replican sus genomas en el citoplasma usan como blanco el nucléolo para modular mecanismos específicos. Muchos virus ARN de polaridad positiva ssARN (+) expresan proteínas de la cápside que tienen como blanco el nucléolo. Estas proteínas son suficientemente pequeñas para entrar por difusión a través de los canales y poros nucleares dentro del núcleo. Aparte de las proteínas de la cápside de virus ssARN (+), otras proteínas de virus (+) ss y ssARN (-) también son capaces de usar al nucléolo como blanco, como por ejemplo la proteína no estructural nsP2 del virus del bosque de Semliki (Fazakerley y cols., 2002; Breakwell y cols., 2007), la proteína P3 del virus de la rabia (Oksayan y cols., 2015) o la proteína no estructural NSs de bunyavirus (Gouzil J y cols., 2017).

Para los virus, atacar al nucléolo tiene como consecuencia el control de las funciones nucleolares entre las que encontramos las respuestas al estrés celular, ciclo celular y apoptosis (Boulon y cols., 2010; James y cols., 2014; Tsai y Pederson, 2014). Esta manipulación de las funciones nucleolares, induce una situación celular que favorece la producción viral, la propagación y una inhibición/evasión de respuestas celulares antivirales (Lyles, 2000; Whelan, 2013; Bagga y Bouchard, 2014; Rawlinson SM y Moseley GW, 2015).

5.-Desarrollo de fármacos antivirales eficaces.

Pese a ser una amenaza constante para los humanos, animales y plantas, carecemos de tratamientos para muchos virus. Los virus emergentes o reemergentes son una preocupación de las autoridades ya que representan un importante problema de salud pública (Howard y Fletcher, 2012). En el caso de virus ARN, los cuales debido a su alto nivel de multiplicación y mutación están cambiando constantemente, encontramos que como ocurre con el virus de la gripe, existen vacunas y medicamentos antivirales, pero surgen a menudo virus resistentes (To y cols., 2015). Debido a todas estas razones, se necesitan con urgencia nuevos antivirales de amplio espectro (Howard y Fletcher, 2012; García-Serradilla M y cols., 2019). La estrategia tradicional en el desarrollo de fármacos antivirales se basaba en el desarrollo de moléculas dirigidas específicamente contra una proteína viral. La mayoría de los tratamientos antivirales aprobados son, por lo tanto, muy específicos para un virus concreto. Esta estrategia ha servido para el tratamiento de ciertos virus como el VIH o el VHC (Barre-Sinoussi y cols., 2013; Li y De Clercq, 2017). Sin embargo, los antivirales de acción directa (DAA) tienen algunos inconvenientes. El desarrollo de un nuevo compuesto eficaz conlleva un gran consumo de tiempo y recursos (DiMasi y cols., 2016). Todo el proceso, desde el descubrimiento de un nuevo medicamento hasta su aprobación para ser utilizado en humanos, puede llevar varios años, en general de 12 a 16 años (Nosengo, 2016). Inicialmente, para el descubrimiento de nuevos fármacos, el tiempo empleado se sitúa entre 3 y 6 años. A continuación, se realizan los estudios preclínicos, generalmente en modelos animales, con el objetivo de estudiar la eficacia y la seguridad de una molécula antes de ser probada en humanos. Estos estudios suelen durar aproximadamente 3 años. Si una molécula ha mostrado resultados prometedores en la fase de experimentación animal, entonces se inician los ensayos clínicos en humanos. Estos ensayos, desde la fase I hasta la fase III, generalmente tienen una duración aproximada de 5 años. Finalmente, si todas las pruebas han sido exitosas el fármaco deberá obtener la aprobación de la agencia correspondiente. Al final se estima que sólo alrededor del 5% de las moléculas candidatas pasan con éxito todo el proceso.

El coste necesario para todo este procedimiento se estima en aproximadamente de 1000 a 2000 millones de dólares (DiMasi y cols., 2016). Viendo los recursos que consume la elaboración de un fármaco eficaz, la estrategia de un medicamento frente a un único virus no parece el enfoque más rentable. Adicionalmente, el uso de DAA puede provocar la aparición de virus resistentes a estos fármacos debido a la elevada tasa de mutación que poseen los virus (Ilyidogan y Anderson, 2014; Menéndez-Arias y cols., 2014; Perales y cols., 2015).

Frente a esta limitación, en la actualidad se están desarrollando nuevas estrategias. Para ello, se están desarrollando moléculas capaces de atacar varios de los factores celulares del huésped y que resultan necesarios para la replicación viral, así como funciones enzimáticas virales que sean comunes entre diferentes virus (Bekerman y Einav, 2015). Con esta estrategia, pese a que los virus podrían encontrar rutas alternativas para replicarse en el hospedador, la aparición de virus resistentes es menos probable (Lin y Gallay, 2013; Zeisel y cols., 2013). El principal inconveniente de este enfoque, es que, al inhibir elementos en una célula huésped hay mayor probabilidad de producir efectos secundarios indeseables en el paciente, en comparación con los medicamentos que se dirigen a una proteína viral. Por todo esto, es de vital importancia desarrollar modelos y aplicar técnicas que nos permitan conocer con precisión los mecanismos de acción de estos fármacos, así como sus posibles efectos adversos.

5.1.- Reposicionamiento de fármacos.

El reposicionamiento de fármacos es un enfoque alternativo en el tratamiento tanto de infecciones virales como de otras enfermedades. Esta estrategia se basa en la utilización de fármacos ya aprobados para otras condiciones/patologías, situación que favorece una solución más rápida y menos costosa en la elaboración de nuevos tratamientos para las infecciones virales (Mercorelli y cols., 2018; García-Serradilla M y cols., 2019). Otra ventaja, frente al procedimiento seguido en el desarrollo de nuevos fármacos es que, en el reposicionamiento de fármacos éstos ya han pasado un número significativo de pruebas, su seguridad es conocida y por lo tanto el riesgo de fracaso se reduce. Aunque la mayoría de veces estas drogas de reposicionamiento no precisan de los ensayos clínicos de la fase I, sí deberán pasar por las fases de ensayos II y III para probar su eficacia para la nueva enfermedad (Nosengo, 2016; García-Serradilla M y cols., 2019). En el caso de los medicamentos genéricos, estas drogas podrían ya por lo tanto haber perdido sus patentes. En estos casos, si para estos medicamentos se ha creado una nueva formulación o un nuevo uso médico, se pueden obtener nuevas patentes. Recientemente se ha experimentado una mayor atención a estos medicamentos por parte de los médicos e investigadores, y gracias a los estudios ejercidos en los centros académicos y la realización de ensayos clínicos se está facilitando la reutilización de fármacos (Nosengo, 2016; García-Serradilla M y cols., 2019). En la actualidad nos encontramos con miles de medicamentos que ya han pasado los ensayos clínicos y que tienen aprobado su uso seguro en humanos. Estas colecciones de medicamentos son una gran fuente de posibles candidatos como antivirales ya que muchos de estos compuestos han mostrado resultados prometedores en estudios preclínicos (García-Serradilla M y cols., 2019).

6.- Ribavirina (1-β-D-ribofuranosy-l,2,4-triazol-3-carboxamida).

Ribavirina (RBV) es un nucleósido sintético análogo de la purina sintetizado por primera vez por Sidwell y colaboradores en 1972 (Sidwell y cols., 1972; Streeter y cols., 1973). La estructura de RBV no resulta similar a ninguno de los nucleósidos naturales, sin embargo sí es parecido en estructura al ribonucleótido 5-Aminoimidazol-4-carboxamida (AICAR), un precursor de la biosíntesis de purinas. AICAR es un intermediario en la síntesis de novo de los nucleótidos de purina (Parker WB, 2005). RBV muestra una actividad antiviral frente a un amplio rango de virus tanto ADN como ARN *in vitro* y en modelos animales. Actualmente es usada en la clínica como monoterapia para tratar el virus respiratorio sincitial (Gilbert y Wyde, 1998; Krilov, 2001; Xu Z y cols., 2004) y en combinación con el interferon alfa para el tratamiento de infecciones causadas por el virus de la hepatitis C (Cummings y cols., 2001; Di Bisceglie y cols., 2001; Mori K y cols., 2011). RBV también ha sido usada experimentalmente frente a otros virus, incluyendo el virus de la fiebre de Lassa (Andrei y De Clercq, 1993; Crotty S y cols., 2002; De Clercq, 2004a,b) y otras infecciones virales causantes de fiebres hemorrágicas como la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo (Fisher-Hoch SP y cols., 1995; Espy N y cols., 2018).

6.1.-Mecanismos de acción de RBV.

Después de más de 40 años desde su descubrimiento, los mecanismos de acción de la RBV no están aún esclarecidos por completo. En general hay cinco mecanismos primarios de acción propuestos para la RBV (Parker WB, 2005; Graci y Cameron, 2006; Nystrom K y cols., 2019).

-Mecanismos indirectos: Reducción de los “*pools*” celulares de guanosina trifosfato (GTP) mediante la inhibición de la enzima “*Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase*” (IMPDH); Inmuno-modulación de la respuesta inmune de tipo Th1, activando la producción de interferón gamma y otras citoquinas y quimioquinas.

-Mecanismos directos: Inhibición del “*capping*” del ARN viral (Goswami BB y cols., 1979; Graci y Cameron, 2006); inhibición de la ARN polimerasa viral dependiente de ARN (RdRp), la RTP se acumula en las células en niveles suficientemente altos como para competir con los nucleótidos celulares, y de este modo la RTP puede interaccionar con la RdRp como análogo tanto de GTP como de ATP. Esta interacción podría bloquear a la RdRp, podría incorporarse y desplazar al substrato sin ser un substrato para la enzima, o podría funcionar como un substrato alternativo para la polimerasa produciendo la terminación de la cadena (Parker WB, 2005); mutagénesis, produciendo un error catastrófico en la replicación viral. Quizás este último sea el mecanismo de acción más documentado (Cameron y Castro, 2001; Dixit NM y Perelson AS, 2006; Mejer N y cols., 2018).

En la actualidad nuevos mecanismos están siendo propuestos para RBV, como es la alteración de los lípidos celulares (Younossi ZM y cols., 2016; Satoh S y cols., 2017; Satoh S y cols., 2019).

6.2.- Metabolismo y toxicidad de RBV.

RBV es fosforilada intracelularmente y convertida en formas mono- (RMP), di-(RDP) y trifosfato (RTP). Estas formas fosforiladas están relacionadas con los distintos mecanismos de acción descritos. Esta fosforilación es un proceso rápido, de modo que en cultivos celulares los niveles máximos de los metabolitos son alcanzados en unas pocas horas de exposición (Page T y Connor JD, 1990). Aunque la concentración relativa de las formas mono-, di- y trifosforiladas varía según el tipo celular, RTP es por lo general el metabolito intracelular más abundante en células de mamífero (Smee y Matthews, 1986; Page T y Connor JD, 1990; Graci y Cameron, 2005; Jimmerson y cols., 2014). RTP actúa como competidor de los “pools” de GTP y ATP celular (Graci y Cameron, 2005) donde la concentración intracelular de RTP es similar a la de ATP y GTP encontrada en células no tratadas (Jones, 1980). RBV no se encuentra en el ADN ni ARN celular ni tampoco altera la ARN polimerasa I, ARN polimerasa II, o polimerasa (A) (Muller y cols., 1977; Eriksson y cols., 1977; Rankin JT y cols., 1989; Parker WB, 2005).

La toxicidad de RBV depende de la línea celular. Los hepatocitos sufren una mayor toxicidad, así como las células no nucleadas como los glóbulos rojos (Ilyin GP y cols., 1997; Russmann y cols., 2006; Page T y cols., 1990). Las concentraciones usadas en los modelos *in vitro*, así como *in vivo* no muestran alteración significativa de la viabilidad celular (Shimojima M y cols., 2014; Kihira S y cols., 2014; Lee MJ y cols., 2016). En las células Vero, concentraciones altas de RBV (> 62.5ug/mL) han mostrado una disminución en la viabilidad de las células (Lee MJ y cols., 2016). En resumen, al ser un análogo de las purinas, RBV interfiere con procesos celulares y virales. Los efectos antivirales de RBV se desarrollan mediante múltiples mecanismos de acción que actúan de forma simultánea, alterando el ciclo vital de los virus en diferentes etapas.

7.- Nanopartículas de plata (AgNPs).

Los avances recientes en nanotecnología han permitido el uso de las propiedades de las nanopartículas de plata (AgNPs) en la industria biomédica (Burdusel y cols., 2018; Ullah Khan y cols., 2018). El efecto antibacteriano de la plata es conocido desde la antigüedad (Barillo y Marx, 2014; Chowdhury S y cols., 2014). También han mostrado su efecto en tratamientos contra parásitos (Murugan y cols. 2015) así como una actividad anti-cancerígena (Thapa RK y cols., 2017; Venugopal K y cols., 2017a,b).

En los últimos años diversos estudios han demostrado también la actividad antiviral de las AgNPs, que resultan efectivas frente a una variedad de virus, incluyendo el virus del VHS (Baram-Pinto y cols., 2009), RFV (Borrego y cols., 2016), virus de la gripe (Papp I, 2010; Xiang y cols., 2013, 2011), VIH-1 (Elechiguerra y cols., 2005; Sun RW y cols., 2005; Lara y cols., 2010), el virus del Dengue (Sujitha y cols., 2015; Murugan y col., 2016), el VHB (Lu L y cols., 2008), CHIKV (Sharma V y cols., 2019) y el virus de Tacaribe (Speshock y cols., 2010). También están siendo usadas contra los vectores, mostrando una alta efectividad contra los mosquitos *in vitro* e incluso en condiciones de campo. (Murugan y cols., 2015; Suresh y cols., 2015).

7.1.- Mecanismos de acción.

Las AgNPs poseen un área grande de superficie por unidad de masa y liberan continuamente iones de plata en el medio en el que se encuentran, lo que les confiere propiedades antibacterianas y antivirales. El mecanismo de acción antiviral de los AgNPs no está bien definido. Las AgNPs poseen la capacidad intrínseca de unirse a células de mamíferos y penetrar fácilmente (Pongrac IM y cols., 2018).

Se han descrito varios mecanismos de acción antiviral de las AgNPs:

- Las AgNPs son capaces de ejercer su acción mediante la liberación de iones Ag⁺ libres y subsiguientes especies reactivas de oxígeno (ROS). También producen la inactivación de macromoléculas esenciales (proteínas, enzimas y nucleótidos) (Akter M y cols., 2018).
- Se cree que las AgNPs podrían interferir con la entrada de los virus en la célula a nivel de fusión de las partículas virales con la membrana plasmática (Mehrbood P y cols., 2009) o induciendo directamente cambios estructurales en el virión volviéndolo no infectivo debido a la unión fisicoquímica de las AgNPs a la superficie, produciendo alteraciones estructurales y funcionales (Elechiguerra y cols., 2005; Xiang y cols., 2013).
- Las AgNPs pueden interaccionar con moléculas en el interior celular. Los iones de plata (Ag⁺) pueden reaccionar con tioles y grupos fosfato presentes en proteínas y ácidos nucleicos, lo que podría estar inhibiendo etapas posteriores a la entrada viral al bloquear las proteínas del virus. También podrían estar reduciendo las tasas de transcripción viral mediante la unión directa con las moléculas de ADN o ARN (Lara y cols., 2010).

En la actualidad se están desarrollando geles tópicos con AgNPs que podrían ser útiles para prevenir las infecciones de transmisión sexual como el VIH y el VHS (Lara y cols., 2010), así como el desarrollo de terapias tópicas para el tratamiento de úlceras y heridas (Zulkifli y cols., 2017; Gong CP y cols., 2018).

7.2.- Síntesis de AgNPs.

Hay varios métodos que permiten la síntesis de las AgNPs, incluidos los métodos físicos, químicos y biológicos. Dependiendo del tamaño y de la técnica utilizada para preparar las AgNPs, sus propiedades y toxicidad pueden variar (Thorley y Tetley, 2013; Zhang T y cols., 2013).

Sin embargo, en la producción clásica de las AgNPs a través de la síntesis redox, se ha observado que el uso de químicos como agentes reductores requiere importantes gastos energéticos y resultan peligrosos. En la actualidad hay un interés creciente en el uso de agentes reductores ambientalmente seguros, la denominada “síntesis verde” (Okafor y cols., 2013; Sharma G y cols., 2018; Sharma V y cols., 2019). Esta síntesis verde, emplea un procedimiento de reducción mediante el uso de un material de base natural donde podemos encontrar: bacterias, hongos, levaduras, plantas y extractos de plantas, o pequeñas biomoléculas como vitaminas, aminoácidos o polisacáridos (Gurunathan S y cols., 2009; PS P y KST, 2017). Se ha visto que las AgNPs sintetizadas mediante estos métodos son capaces de inhibir las partículas virales e interferir con los mecanismos de replicación viral (Haggag EG y cols., 2019; Sharma V y cols., 2019).

7.3.-Toxicidad.

Existen diversas propiedades físico-químicas de las AgNPs que están involucradas en su toxicidad intrínseca, como son principalmente el tamaño, estado de aglomeración, la forma y superficie, la carga superficial y la solubilidad (Carlson y cols., 2008; Horie y cols., 2012). Basándonos en los datos publicados, las AgNPs han mostrado toxicidad tanto a nivel celular como en modelos *in vivo*. En algunos modelos *in vivo*, las AgNPs han mostrado la capacidad de provocar alteraciones estructurales y fisiológicas en órganos vitales (Zhang T y cols., 2013; Lin CX y cols., 2017; Ribeiro y cols., 2018). A nivel celular, numerosos estudios han demostrado que la exposición a las AgNPs produce una disminución de la viabilidad celular a través de diferentes mecanismos. Las AgNPs pueden inducir daño oxidativo significativo en la membrana plasmática, el núcleo, las mitocondrias y los lisosomas (Asharani y cols., 2009; Luther EM y cols., 2011; Zhang T y cols., 2013). Se ha observado que la toxicidad de las AgNPs, que principalmente está relacionada con la liberación de Ag⁺, depende del tamaño de las partículas de plata. Cuanto más pequeño es el tamaño mayor es la cantidad de Ag⁺ liberados. Las AgNPs inducen la liberación del citocromo c mitocondrial al citosol y además provocan la pérdida del potencial de membrana mitocondrial. El citocromo c liberado al citosol provoca la activación de las caspasas 9 y 3 activando el proceso de apoptosis (Hsin y cols., 2008; Gliga AR y cols., 2014). Se ha publicado que las AgNPs producen un aumento en el estrés oxidativo (Hsin y cols., 2008), genotoxicidad (Asharani y cols., 2009) y citotoxicidad (Hussain y cols., 2005). La alta exposición de las células a los AgNPs induce la

producción de altos niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) y activación de JNK y p53 que conduce a la apoptosis celular mitocondrial (Hsin y cols., 2008). También pueden causar anormalidad cromosómica, daño en el ADN (Barcinska E y cols., 2018) y posible mutagenicidad (Zhang T y cols., 2014).

Aunque el uso de AgNPs para aplicaciones biomédicas se ha descrito como prometedor, se necesitan más estudios para comprender mejor su mecanismo de acción, su especificidad celular, toxicidad y efectos a largo plazo sobre la salud humana y el medio ambiente, con el fin de generar compuestos nuevos más efectivos, así como terapias combinadas con otros medicamentos para el tratamiento de infecciones causadas por virus.

8.-Técnicas de imagen como herramienta para el estudio de fármacos antivirales.

A pesar del aumento del impacto de los virus emergentes y re-emergentes que han aparecido en los últimos años, aún no se han aprobado fármacos para tratar a la mayoría de los virus más peligrosos. Una de las estrategias actuales para desarrollar fármacos antivirales consiste en la búsqueda de rutas celulares utilizadas por diferentes virus, ya que son numerosos los virus que modifican diferentes rutas celulares para construir los orgánulos de replicación. Para comprender los mecanismos de estos procesos, la combinación de métodos como la microscopía óptica (MO) y electrónica, bioquímica, biología celular, lipidómica y proteómica, se muestra como herramienta de gran utilidad para conocer los mecanismos implicados en la replicación de los virus y cómo estos construyen sus factorías virales. Esta información permitirá identificar nuevos blancos para el desarrollo de fármacos antivirales y para la validación de fármacos de amplio espectro con los que tratar a muchos de estos virus emergentes y re-emergentes.

En la Microscopía de Fluorescencia (MF), la existencia de marcadores clonables, como la proteína fluorescente verde o GFP, han supuesto una auténtica revolución en biología celular y virología (Giepmans y cols., 2006; O'Hare y cols., 2007; Robinson y cols., 2007), haciendo posible estudiar en células vivas las interacciones dinámicas entre los virus y la maquinaria celular.

La ME, es una técnica que sigue estando en la vanguardia de la identificación de virus, particularmente cuando los agentes son desconocidos (Gentile M y Gelderblom, 2014; Gencer D y cols., 2018; Richert-Pöggeler KR y cols., 2019). La ME nos permite estudiar todo el contexto subcelular no fluorescente, pudiendo estudiar todos los orgánulos celulares, membrana celular o complejos macromoleculares de mayor tamaño como ribosomas o nucléolos, así como elementos del citoesqueleto, aportando una información de ultraestructura adicional y

aportando una relación con lo observado en la MF (Caplan J y cols., 2011; Boer P y cols., 2015; Müller-Reichert T y Verkade, 2017). También es una valiosa técnica en la vigilancia de enfermedades emergentes y re-emergentes, así como de agentes potenciales de bioterrorismo. Recientemente, estudios de MO y ME, junto con Microscopía Correlativa óptica-electrónica, en inglés “*Correlative Light and Electron Microscopy*” (CLEM) han generado nuevos conocimientos sobre la estructura y funcionamiento de los complejos replicativos virales, así como de los cambios en los orgánulos celulares inducidos por el virus en la célula huésped. La CLEM nos ofrece un análisis multiescala, multimodal y multidimensional de una misma muestra (Risco y cols., 2014; Bykov YS y cols., 2016; Fernández de Castro y cols., 2017; Tenorio y cols., 2018; Sachse y cols., 2019 *en prensa*). En este tipo de estudios, la MO (normalmente MF) proporciona una visión general de un gran número de células, donde podemos identificar subpoblaciones celulares y eventos particulares de interés. Posteriormente una vez seleccionadas las células de interés, éstas son estudiadas mediante ME, lo que nos permite obtener información de mayor resolución de eventos intracelulares concretos (Caplan J y cols., 2011; Boer P y cols., 2015, Muller-Reichert T y Verkade, 2017). La CLEM también constituye una herramienta de gran utilidad en el estudio de los mecanismos de acción de compuestos antivirales (Berger y cols., 2014; Lowen y cols., 2018; García-Serradilla M y cols., 2019).

Otra de las aproximaciones técnicas que ha tenido una gran aportación al conocimiento de las factorías virales es la técnica de Tokuyasu (Tokuyasu y cols., 1973; Sachse y cols., 2018). Este método de inmunolocalización suele producir marcajes efectivos, ya que mediante esta técnica se evita la deshidratación de la muestra antes de la inmunolocalización de componentes específicos. Esto permite preservar los epítomos de las proteínas y una buena visualización de endomembranas si bien estructuras con alto contenido proteico son invisibles.

En esta tesis se ha estudiado el ciclo vital de VBUN en células Vero, lo que nos ha permitido obtener detalles nuevos acerca de la morfogénesis de VBUN en este tipo celular. También se han estudiado los cambios producidos en el ciclo vital de VBUN como consecuencia del tratamiento de dos compuestos antivirales, la RBV y las AgNPs. Esto ha permitido proponer nuevos mecanismos de acción de estos fármacos y de posibles mecanismos de evasión a los mismos.

Objetivos

- 1) Caracterizar la biogénesis y estructura de las factorías virales ensambladas por el virus Bunyamwera (VBUN) en células Vero mediante microscopía de células vivas, microscopía confocal, microscopía electrónica de transmisión y microscopía correlativa óptica-electrónica.
- 2) Determinar la capacidad antiviral de Ribavirina y Nano-partículas de plata en células Vero infectadas con VBUN con una combinación de técnicas de imagen.
- 3) Caracterizar las causas de la aparición de resistencias a los fármacos antivirales en células Vero infectadas con VBUN.

Materiales y Métodos

1.- Materiales

1.1.- Células y virus

Células Vero: células epiteliales de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*). Se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (*American type culture collection*, ATCC; referencia CCL-81). Se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (*Dulbecco's modified eagle's medium*, DMEM; Gibco/Invitrogen), suplementado con 4,5 g/l de glucosa, 1% de aminoácidos no esenciales (Sigma-Aldrich), glutamina (Sigma-Aldrich) 200 mM, gentamicina (Sigma-Aldrich) 50 µg/ml, penicilina/estreptomicina 100 U/ml / 100 µg/ml y suero fetal bovino (*fetal bovine serum*, FBS; Reactiva S.A.) al 10%.

Virus Bunyamwera (VBUN): Se obtuvo en la ATCC, con referencia BR-87.

Virus quimera rBUNGc-eGFP, expresando la proteína fluorescente GFP (*"Green Fluorescence Protein"*) fusionada en el segmento M a la proteína Gc, generado por genética reversa (Shi y cols., 2010) cedido por Dr. R.M. Elliott (*University of Glasgow*, Reino Unido).

Virus rBUN-DelNSs, virus mutante con la proteína NSs delecionada, generado mediante genética reversa (Bridgen A y cols., 2000) cedido por Dr. R.M. Elliott (*University of Glasgow*, Reino Unido).

1.2.- Anticuerpos

-Anticuerpos frente a proteínas de VBUN

El anticuerpo policlonal generado en conejo contra la forma extracelular del VBUN (anti-VBUN) y el anticuerpo monoclonal Mab742 contra la glicoproteína Gc del VBUN (anti-Gc) descritos en (Weber y cols., 2001; Lappin y cols., 1994; Watret y cols., 1985) fueron cedidos por el Dr. R.M. Elliott (*University of St. Andrews*, Escocia). El anticuerpo policlonal de conejo contra la nucleocápsida (anti-N), fue generado mediante inmunización con el péptido sintético MIELEFHDVAANTSST correspondiente a la región amino-terminal (Fontana y cols., 2008). El anticuerpo policlonal de conejo contra la proteína no estructural NSs (anti-NSs), fue cedido por el Dr. R.M. Elliott, (*University of Glasgow*, Reino Unido).

-Anticuerpos contra proteínas celulares

Para marcar el aparato de Golgi, se utilizó el anticuerpo policlonal de conejo (PRB-1140 Biologend) específico para gigantina, proteína de las regiones cis y media del Golgi.

Para marcar el TGN (*"Trans-Golgi Network"*) se utilizó el anticuerpo policlonal de conejo Anti-TGN-46 (NBP1-49643SS Novus Biologicals).

Para detectar proteínas mitocondriales se utilizó el anticuerpo monoclonal de ratón específico del receptor mitocondrial TOM 22, (T6319 Sigma-Aldrich).

-Anticuerpos secundarios:

Los anticuerpos secundarios anti-ratón fueron: anti-ratón verde conjugado con Alexa 488 (A1102, Invitrogen) y anti-ratón rojo conjugado con Alexa 594 (A21203, Invitrogen). Los anticuerpos secundarios anti-conejo fueron: anti-conejo verde Alexa 488 (A-210206, Invitrogen) y anti-conejo rojo Alexa 594 (A-21207, Invitrogen). Para *western blot* se usó como control de carga Anti- β -actina (monoclonal de ratón, AC-15, Sigma). Los anticuerpos secundarios asociados a peroxidasa de rábano, (HRP en inglés) para su uso en *western blot* fueron comprados a Amersham-Bioscience. El kit para el revelado de la reacción de HRP, *Enhanced Chemiluminescence (ECL) Plus Western Blotting Detection*, es de Amersham-GE Healthcare.

Para los inmunomarcajes de microscopía electrónica (ME) se usaron anticuerpos secundarios monoclonales y policlonales conjugados con oro coloidal de 5 y 10 nm de diámetro de *British Biocell International Ltd., Cardiff*, Reino Unido.

1.3.- Sondas

Como marcador del ADN nuclear se usó DAPI, del inglés “4',6- diamidino-2-phenylindole”, (Sigma-Aldrich Co.). Los marcadores de mitocondria fueron: Mitotracker Deep-Red 633 en DMSO (M-22426) y Mitotracker Green en DMSO (M-7514) de Molecular Probes.

1.4.- Otros reactivos

El marcador de pesos moleculares para electroforesis en gel de poliacrilamida y *western blot* fue el *Precision Plus Protein TM Dual Color Standards*, de Bio-Rad Laboratories Inc., EEUU.

El medio de montaje para inmunofluorescencia (IF) (ProLong) y la saponina, utilizada para la permeabilización de las células, se obtuvieron en Sigma-Aldrich.

Tripsina-EDTA, 0,1 M (Tripsina al 0,25% y EDTA al 0,02% en PBS 1x).

Para Tokuyasu: NH₄Cl 5M en agua miliQ, sacarosa 2,3 M en PBS, gelatina de cerdo 12% en PBS, metil-celulosa 2% en agua miliQ.

Detergente NP40, (Sigma).

Tween 20, (TAAB).

Tetróxido de Osmio, (TAAB).

Ferricianuro Potásico, (Sigma).

Formvar, (TAAB).

Acetato de uranilo, (TAAB).

Inhibidores de Proteasas, (Roche Molecular Biochemicals).

Ácido tánico, (TAAB).

Glutaraldehído, (TAAB).

-Tampones:

-PBS (del inglés "*Phosphate buffered saline*"), 1 mM pH 7,2-7,4: 0,273 M NaCl; 0,053 M ClK; 0,032 M Na₂HPO₄·12H₂O; 3 mM KH₂PO₄.

-PBS-Tween 0, 1%: PBS 1 mM pH 7,2-7,4, 1 ml de Tween 20 por litro de PBS.

-PBS-Tween 0, 3%: PBS 1 mM pH 7,2-7,4, 3 ml de Tween 20 por litro de PBS.

-HEPES (del inglés "*4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*") 0,4 M pH, 7,2-7,4.

-Tris-HCl 0,01 M pH 7,4: 0,01 M NaCl; 0,01 M Tris; 2 ml EDTA al 0,5 M.

-Tampón de transferencia de membranas para *western blot*, pH 9-9,4: 0,047 M Tris Base; 0,01M Glicina; 0,75 ml de SDS al 10%; 20% metanol.

-TEN 10 mM pH 7,4: NaCl 0,1 M; 0,01 M Tris-HCl, 1 mM EDTA.

-Tampón de electroforesis o "*running buffer*" para geles de poliacrilamida al 10 %: PBSx10 y SDS al 10 %.

-Tampón de bloqueo para *Western blot*, para 500 mL, leche en polvo al 3%, Tween-20 al 0,05 % en PBS.

-Fijadores:

Fijador para microscopía óptica de fluorescencia: Paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS 1x.

Fijador para monocapas para realizar titulaciones virales: Formaldehído al 10% en PBS 1x.

Fijador para monocapas incluidas en resina Epoxi EML-812: Tampón HEPES 0,4 M pH 7,2-7,4, glutaraldehído al 1% y ácido tánico al 0,5%.

2.- Análisis Bioquímicos

2.1.- Transferencia e inmunodetección (*western blot*)

Para la detección de proteínas partimos de un gel de poliacrilamida donde las proteínas son separadas mediante PAGE-SDS (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico), a continuación, son transferidas a una membrana de PVDF o de nitrocelulosa Trans-Blot® *Transfer Medium* con tampón de transferencia y con un sistema de transferencia semi-seca Trans-Blot *Semi Dry Transfer Cell*, de Bio-Rad Laboratories Inc. La transferencia se realizó a 15 v durante 50 min. El tiempo y el voltaje pueden variar y ser ajustado según el peso

molecular de las proteínas que se quieran transferir. Previo a la detección de las proteínas de interés con anticuerpos es necesario un bloqueo de la membrana con un tampón de bloqueo durante toda la noche a 4°C y en agitación. Con este bloqueo se evitan las uniones inespecíficas. Posteriormente, la membrana se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo primario diluido también en tampón de bloqueo. Posteriormente se realizaron tres lavados de 5 min, con Tween-20 al 0.1% y en agitación lo cual permite la eliminación de los anticuerpos que no se hayan unido a su blanco. Después de los 3 lavados, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con HRP durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación. A continuación, se realizaron dos lavados con Tween al 0.1% y un lavado con Tween al 0.3%, y se incubó con los reactivos del kit ECL. La reacción de quimioluminiscencia genera un sustrato luminiscente que permite la obtención de imágenes en una reveladora digital provista con los filtros de longitud de onda apropiada que permite la digitalización de la imagen para su análisis.

3.- Biología celular y Virología

3.1.- Cultivo de células Vero

Las células Vero se conservaron congeladas en nitrógeno líquido. La congelación se realizó en criotubos con medio DMEM y un 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), agente crioprotector, a -80°C en un contenedor con isopropanol. De este modo, se consigue que la congelación de las células sea gradual y con menor daño. Posteriormente, las células se almacenaron en los tanques de nitrógeno líquido. Para la descongelación, se introdujeron los criotubos en un baño a 37°C, se eliminó el medio con DMSO mediante centrifugación y las células se resuspendieron en medio Dulbecco con FBS al 10%.

Para el cultivo de las células Vero se utilizó un incubador a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa. Para el mantenimiento de la línea celular se realizaron pases cada 2-3 días en medio DMEM/FBS al 10%. En el proceso de levantamiento de las células de la placa se utilizó una mezcla de tripsina y EDTA. Para ello las células eran incubadas con esta mezcla durante 5 min a 37°C; así, las células se levantan de la placa. Una parte de estas células levantadas es usada para generar un cultivo nuevo añadiendo según confluencia deseada el porcentaje necesario de medio nuevo. La confluencia de las células se controló con un microscopio óptico invertido Zeiss Axiovert 40 CFL (Carl Zeiss Int., Jena, Alemania).

3.2.- Infección de las células Vero

-Propagación del stock original de VBUN y rBUN-DelNSs en células de mamífero

Con la finalidad de generar los stocks virales con los que realizar las infecciones, se propagó VBUN y rBUN-DelNSs en células Vero. Se pusieron a crecer células Vero en una placa p150 y con medio DMEM-FBS 10% a 37°C. Cuando se alcanzó la confluencia máxima, se infectó a 0.001 UFP/célula. Esta multiplicidad baja es usada para que las células no mueran a las pocas horas y puedan producir una gran cantidad de virus. Estas células se incubaron a 37°C durante 1h con el inóculo viral, agitándose cada 15 min. Pasada la hora de adsorción viral, se retiró el inóculo, se añadió DMEM/FBS al 2% y se incubó durante 3-4 días a 32°C. La temperatura de incubación usada es inferior a la óptima de crecimiento, así se consigue ralentizar el metabolismo celular y la dinámica de la infección, consiguiendo que las células produzcan mayor cantidad de virus.

A los 3-4 días post-infección (dpi) se recogió el sobrenadante y se centrifugó 5 min a 1.400 rpm para eliminar los restos celulares. Se hicieron alícuotas y se congelaron a -80°C.

-Propagación del stock original de rBUNGc-eGFP

El virus rBUNGc-eGFP mediante un mecanismo desconocido hasta ahora, mutan a su composición genómica original, escindiendo la secuencia correspondiente a la eGFP y perdiendo su utilidad como virus fluorescente. Para generar este stock y evitar perder la señal de eGFP, se seleccionaron sólo los focos de infección que eran capaces de expresar eGFP. Para ello se infectaron células Vero con rBUNGc-eGFP y se cultivaron en medio de cultivo solidificado con metilcelulosa al 1 % y se incubaron a 32°C. Tras 2 d.p.i. mediante el uso de un microscopio de fluorescencia se recogieron con una pipeta estéril todos los focos positivos en fluorescencia y se disolvieron en PBS. Estas alícuotas se titularon y almacenaron.

-Infecciones con VBUN, rBUNGc-eGFP y rBUN-DelNSs

Se infectaron monocapas de células Vero confluentes con los diferentes virus y con diferentes cantidades de virus según los experimentos a realizar. La cantidad de virus depende del título del stock viral, del número de células en la placa y de la multiplicidad a la que se quiera infectar, unidades formadoras de placa por célula (UFP/célula). Generalmente, se infecta a 1 UFP/célula cuando se usa el VBUN, en el caso de células Vero infectadas con rBUNGc-eGFP y rBUN-DelNSs, se infectó también a 5 UFP/célula, debido a que estos virus crecen más lentamente que VBUN.

Antes de añadir el inóculo, las células son lavadas con DMEM para eliminar células muertas y restos celulares, a continuación, se añade el inóculo viral con DMEM/FBS 2%, y se mantiene a 37°C durante 1 h, agitando la placa cada 15 min. En esta incubación con el virus se produce la adsorción viral, el movimiento de las placas cada 15 min facilita que los virus presentes en el inóculo viral se unan a los receptores de la superficie celular. Posteriormente, se retira el inóculo viral y se añade medio de cultivo fresco con un porcentaje de FBS al 2% para ralentizar la división celular. Se incuba a 37°C las horas de post-infección (h.p.i.) necesarias según el experimento. Para los virus rBUNGc-eGFP y rBUN-DelNSs se usaron tiempos mayores de post-infección debido a que estos virus presentan crecimiento más lento.

-Titulación de los distintos virus

Después de generar un stock viral se procede a titularlo para conocer la cantidad de virus que hay por unidad de volumen y poder realizar las infecciones a la multiplicidad de infección deseada. También nos permite analizar los sobrenadantes de ciertos experimentos para conocer la cantidad de virus que se ha producido y así poder valorar el efecto de los tratamientos.

Se sembraron células Vero en una placa p24 a la dilución adecuada para que alcancen la confluencia en dos días. En una placa p96 se realizaron diluciones seriadas del virus a titular con medio de dilución (DMEM 1X, glutamina 200 mM, FBS 2%, gentamicina 50 µg/ml, aminoácidos no esenciales (AANE) 10X y DEAE-dextrano 1%). Posteriormente las células confluentes son infectadas con las diluciones seriadas del virus durante 1 h a 37°C agitando cada 15 min. Pasado el tiempo de adsorción viral, se retira el inóculo y se añade medio sólido Overlay (DMEM 2X, glutamina 200 mM, FBS 2%, gentamicina 50 µg/ml, AANE 10X; DEAE-dextrano 1% y agar 0.6%). Las placas son incubadas a 37°C durante 4 días. A los 4 d.p.i., se fijan las células con formaldehído al 10% durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se retira el fijador y el medio sólido y se tiñen las células con cristal violeta durante 5 min a temperatura ambiente. Se lava con agua y se deja secar la placa. Para calcular el título viral se cuenta el número de placas de lisis en cada dilución y se calculan las UFP/ml.

-Titulación de virus intracelulares.

Tras retirar el medio de cultivo, las células infectadas se lavan dos veces con medio de cultivo DMEM para eliminar restos celulares. Para levantar las células se tratan con Tripsina-EDTA 0,1 M (Tripsina al 0,25% y EDTA al 0,02%) durante 5 min a 37°C y se raspan para levantarlas. Las células se recogen en un tubo *Eppendorf* con 600 µL de medio de cultivo suplementado con FBS al 2%, se añade un cuarto de pastilla de inhibidor de proteasas y se congelan a -80°C.

Después de varias horas de congelación, los tubos se pasan a un baño de agua caliente de 37°C. Este proceso de congelación a -80°C y descongelación a 37°C se repite 3 veces para permitir la liberación de virus atrapados en compartimentos membranosos intracelulares. El periodo de congelación en cada ciclo debe ser el tiempo necesario para la congelación completa de las muestras. La suspensión celular y viral se centrifuga durante 8 min a 2000 rpm a 4°C. Después, los sobrenadantes se sonicen en pulsos de 20 segundos durante 2 min a 4°C. Se recogen los sobrenadantes con los virus intracelulares y se almacenan a -80°C para su posterior titulación, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado anterior.

3.3.- Tratamiento con drogas

- Inhibidor del proteosoma MG-132

MG-132 (ab141003 abcam)

Para intentar aumentar la señal de fluorescencia obtenida con el anticuerpo anti-NSs, se trataron células Vero con MG-132. Las células Vero se infectaron con VBUN a 2 UFP/célula y se incubaron a 37°C 5% con CO₂. A las 5 h.p.i., se añadió MG-132 a una concentración de 10 µM. Posteriormente las células fueron fijadas a las 10 h.p.i. y se procesaron para inmunofluorescencia (apartado 4.1). MG-132 se añadió a un tiempo de 5 h.p.i. para evitar alterar cualquier proceso celular temprano mediado por proteosomas, o alterar algún proceso temprano que pudiera usar el virus para su replicación.

-Ribavirina (RBV)

Para valorar la toxicidad de RBV se realizaron 3 pases seriados de células Vero en presencia de 50 µg/mL de RBV y la viabilidad de las células fue comprobada observando su estado con el microscopio óptico invertido Zeiss Axiovert 40 CFL (Carl Zeiss Int., Jena, Alemania).

Para estudiar la capacidad antiviral de RBV en células Vero infectadas con VBUN, las células Vero fueron tratadas con diferentes concentraciones de RBV (10, 20, 32 y 50 µg/mL) que fue añadida a diferentes tiempos de post-infección (1, 6, 10 h.p.i.). Las células infectadas fueron fijadas a diferentes tiempos de post-infección (4, 6, 10, 13, 15 y 24 h.p.i.). RBV se añadió junto con FBS al 2 % en DMEM1x y no fue retirada del medio de cultivo hasta su fijación. También se pre-trataron células Vero con 50 µg/mL de la droga 1 h antes de añadir el inóculo viral.

-Infecciones con los virus que se multiplican en presencia de Ribavirina.*Protocolo para seleccionar virus resistentes a RBV*

En este protocolo, las células Vero fueron infectadas a 1 UFP/célula con VBUN en presencia de RBV 50 µg/mL durante 10 h.p.i. En estos cultivos se recogieron virus intra- y extra-celulares. La infectividad de estos virus se calculó con el protocolo estándar de titulación mediante el ensayo de placas de lisis, pero con una modificación: transcurridos los 3 días de incubación de las muestras, éstas no son fijadas. Las placas de lisis y la periferia de éstas son recogidas con una punta de pipeta y conservadas en medio DMEM a 4°C durante toda la noche para que el virus difunda. Con este método se obtiene un inóculo viral constituido por virus resistentes a la RBV. Con estos virus se usó el mismo protocolo de adsorción viral empleado para los otros 3 virus, se infectaron a 1 UFP/célula, y también a 10 UFP/célula.

En todas las infecciones se usó una confluencia celular aproximada del 50-60% para los estudios de IF mientras que para estudios de ME o *western blot* se usaron confluencias del 100%.

-Nanopartículas de plata (AgNPs)

Para valorar la toxicidad de las AgNPs se realizaron 3 pases seriados de células Vero en presencia de 6 µg/mL de AgNPs. La viabilidad de las células fue comprobada observando el estado de las mismas con el microscopio óptico invertido Zeiss Axiovert 40 CFL (Carl Zeiss Int., Jena, Alemania).

Se trataron células Vero con diferentes concentraciones de AgNPs (1,5, 2, 2,4, 6, 12 y 24 µg/ml) y a diferentes tiempos de post-infección (1, 10, y 24 h.p.i.). Posteriormente las células fueron fijadas a diferentes tiempos de post-tratamiento: a 10 min y a 1, 10, y 24 h. Las AgNPs se añadieron junto con FBS al 2% en DMEM1x y no se retiraron del medio de cultivo hasta la fijación de la monocapa celular. En otros experimentos también se pre-trataron las células con diferentes concentraciones de AgNPs (1,5, 2, 2,4, 6, 12 y 24 µg/ml), 1 h antes de añadir el inóculo viral.

4.- Microscopía óptica de fluorescencia

4.1.- Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

La inmunofluorescencia es una técnica que usa anticuerpos acoplados a fluoróforos para detectar y localizar antígenos específicos en células y tejidos. Para los estudios de microscopía óptica, las células se crecieron en cubre-objetos de vidrio y se fijaron con PFA al 4% a temperatura ambiente durante 20 min. Tras la fijación, se realizaron 3 lavados con PBS de 5 min a cada uno. Las muestras se almacenaron en PBS a 4°C hasta su utilización. Para el marcaje con anticuerpos las células se permeabilizaron durante 10 min con saponina al 0.25% en PBS. A continuación, se procedió a incubarlas 40 min con PBS-saponina al 0.25% y FBS al 2%, para evitar las uniones inespecíficas de los anticuerpos y se incubaron a temperatura ambiente durante 1h con los anticuerpos primarios a la dilución adecuada para cada anticuerpo en saponina al 0,25% y FBS al 2% en PBS. Tras la hora de incubación, se realizaron 3 lavados con PBS durante 5 min cada uno. Posteriormente, se incubó con los anticuerpos secundarios, que reconocen el anticuerpo primario y que van conjugados con un fluoróforo, diluidos en saponina al 0,25% y FBS al 2% en PBS, durante 45 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente se lavaron 3 veces con PBS durante 5 min, también en oscuridad. Para marcar los núcleos se realizó una incubación con DAPI diluido en PBS, saponina al 0,25% y FBS al 2%, durante 20 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras 3 lavados con PBS después de la incubación con Dapi, se procedió al montaje de los cubreobjetos con Prolong. Los análisis de las muestras por microscopía óptica se realizaron en el microscopio de fluorescencia Leica DMI6000B con cámara digital CCD Hamamatsu Orca R2, 12/16 bit 1344x1024 píxeles o en el microscopio confocal multiespectral Leica TCS SP5 (Leica Microsystems GmbH).

-Inmunoabsorción

Algunos anticuerpos primarios fueron tratados mediante inmunoabsorción, la cual permite eliminar uniones inespecíficas de un anticuerpo. Para realizar el proceso se crecieron células Vero sin infectar en una placa P6 y posteriormente se fijaron con PFA al 4% en PBS y se permeabilizaron con saponina al 0,25% en PBS. Se añadió el anticuerpo primario anti-NSs a la dilución 1:100 en PBS y se dejó incubando toda la noche a 4°C. A continuación, se recogió el sobrenadante y se usó como anticuerpo primario.

4.2.- Protocolo para marcaje de proteínas nucleares.

Para estudiar la localización nuclear de la proteína NSs mediante IF, las células se crecieron en cubre-objetos y se fijaron con metanol a -20°C durante 10 min. Tras la fijación, se realizaron 3 lavados con PBS a 4°C. Para el marcaje con anticuerpos, las células se permeabilizaron previamente durante 10 min con saponina al 0,75% y NP-40 al 0,1% en PBS. NP-40 es un surfactante de polioxietileno no iónico frecuentemente usado para abrir poros en todas las membranas celulares, incluida la nuclear. El proceso de marcaje con anticuerpos fue el mismo que se ha descrito en el apartado anterior, con la salvedad que el anticuerpo primario usado frente a la proteína NSs fue limpiado mediante inmunoabsorción.

4.3.- Microscopía de células vivas.

Se utilizó el microscopio de fluorescencia Leica DMI6000B que cuenta con un sistema de incubación con reguladores de CO₂, humedad y temperatura, para realizar estudios de *time-lapse* y con una cámara digital monocromática OrcaR2 para estudiar células vivas. La vídeo-microscopía permite estudios dinámicos *in vivo* y la obtención de información acerca del transcurso de la infección y de la respuesta a tratamientos a tiempo real. Para ello las células fueron crecidas en placas P6 e infectadas con rBUNGc-eGFP. Inicialmente se tomaron imágenes antes de la infección como control de la fluorescencia. A continuación, se establecieron varias posiciones en las que se adquirieron imágenes cada 15 min durante el tiempo necesario requerido para cada experimento (4-40 h.p.i.). Los videos procedentes de las imágenes de vídeo-microscopía de células Vero fueron realizados con el programa informático LAS AF (del inglés "*Leica Application Suite Advanced Fluorescence*").

4.4.- Análisis y procesamiento de las imágenes de microscopía confocal.

Mediante microscopía confocal se obtuvieron planos de todo el volumen celular desde la base hasta la zona apical en el microscopio TCS-SP-5 (<http://rsb.info.nih.gov/ij> Leica). La información obtenida fue analizada con los programas informáticos LAS AF (<https://leica-microsystems.com/>) e IMAGE J (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

-Reconstrucción 3D con el software IMARIS

Se obtuvieron entre 30-50 planos cada 0,2 µm de separación entre plano y plano de cada muestra y se estudiaron con el microscopio TCS-SP-5. Todos los planos fueron procesados posteriormente utilizando el software IMARIS (<https://imaris.oxinst.com>), el cual permite una reconstrucción detallada en 3D mediante la representación de varios algoritmos de volumen y

análisis cuantitativos, usando isosuperficies y segmentación obtenida mediante microscopía confocal.

5.- Microscopía electrónica de transmisión

5.1.- Inclusión en resina para el estudio de la ultraestructura de monocapas celulares orientadas

Las células Vero fueron crecidas en Thermanox® *Plastic Coverslips* (Nunc) (10,5x22 mm Rochester) y se fijaron con una mezcla de PFA 4% y glutaraldehído (GA) 1% en HEPES durante 1 h a temperatura ambiente, lo que se considera una fijación fuerte. Tras la fijación se realizaron 3 lavados con HEPES y las muestras se incubaron con tetróxido de osmio (OsO₄) al 1% y ferricianuro potásico (K₃Fe(CN)₆) al 0.8% durante 1 h a 4°C en oscuridad. A continuación, las células se lavaron 3 veces con HEPES y se incubaron con acetato de uranilo al 2% durante 40 min a 4°C en oscuridad. Estos compuestos son utilizados como agentes de fijación, tinción y contraste. Se realizaron 3 lavados con HEPES para eliminar el acetato de uranilo y se realizó la deshidratación de las células para sustituir el agua por compuestos que sean miscibles con la resina. En el caso de la resina epoxi se utiliza un gradiente de acetona o etanol. Las células se incubaron en concentraciones crecientes de acetona o etanol (50%, 70%, 90% y 2x100%) durante 5 min cada una a 4°C.

Para incluir las muestras en la resina epoxi-EML-812, después de la deshidratación, se infiltraron las muestras con una mezcla de acetona-EML-812 (TAAB Laboratories Equipment Ltd.) en proporción 1:1 dejándose toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, se hicieron dos cambios con resina al 100% para eliminar los restos de acetona. Al cabo de otras 24 horas se volvió a cambiar la resina. Las células crecidas en Thermanox® se polimerizaron en estuches BEEM (Ted Pella Inc.) para inclusión en plano ("*flat-embedding*") a 60°C durante 72 h.

5.2.- Obtención de secciones ultrafinas

En las células crecidas en monocapa sobre un soporte de plástico o Thermanox® fue necesario eliminar primero el plástico y posteriormente el bloque fue tallado manualmente con una cuchilla de acero para obtener un frente en forma de trapecio. Estos frentes se procesaron en el ultramicrotomo Ultracut EM-UC6 (Leica Microsystems GmbH) con una cuchilla de diamante de 45° de inclinación (Diatome Ltd., Beil, Suiza), con la que se obtuvieron secciones ultrafinas de aproximadamente 50-70 nm de grosor.

Para recoger los cortes de la superficie del agua en la balsa de la cuchilla, se usó un asa de hilo fino *Perfect Loop* (Diatome Ltd.). En el caso de secciones de resina epoxi para estudios de ultraestructura se depositaron en rejillas circulares de cobre de 3 mm de diámetro que contenían 200 mesh (cuadrícula compuesta de 200 aperturas) (Gilder Grids, Lincolnshire, Reino Unido) sin plástico. Para la realización de inmunomarcajes se usaron rejillas de oro sin plástico (Gilder Grids, Lincolnshire, Reino Unido). Para la obtención de cortes seriados se utilizaron rejillas de ojal (Gilder Grids, Lincolnshire, Reino Unido) con plástico *formvar* al 0.5%-1%.

5.3.- Tinción de muestras para microscopía electrónica

-Tinción de secciones

Para estudios de ultraestructura, las rejillas de ME con las secciones se incubaron en una gota de acetato de uranilo saturado durante 20 min en oscuridad y a temperatura ambiente. Después, se lavaron con 3 gotas de agua Mili-Q y se dejaron secar 30 min. Posteriormente, se incubaron con citrato de plomo durante 2 min a temperatura ambiente y se lavaron con 3 gotas de agua Mili-Q. Las rejillas se dejaron secar completamente antes de llevarlas al microscopio electrónico.

Para el estudio de las células tratadas con AgNPs, las células se procesaron con el mismo protocolo utilizado para el estudio de la ultraestructura, pero no se realizó la tinción posterior de las secciones con acetato de uranilo y citrato de plomo.

5.4.- Tinción negativa de virus

Para facilitar la adhesión de los virus a la superficie de plástico con carbón que recubre la rejilla, se ionizaron las rejillas con plástico *formvar* y carbón en la unidad de descarga iónica Leica EM MED 020. Las rejillas ionizadas se depositaron sobre una gota de la suspensión de virus durante 2 min. A continuación, se incubó con acetato de uranilo al 2% durante 30 seg a temperatura ambiente, se eliminó el exceso de líquido con el papel de filtro y se dejó secar. La visualización mediante ME se realizó con un microscopio Jeol JEM 1011 a un voltaje de 100 kv. Las imágenes se obtuvieron mediante una cámara digital acoplada al microscopio CCD 785-ES 1000W Erlangshen (Gatan Inc., Pleasanton, EEUU).

5.5.- Inmunomarcaje de criosecciones mediante el método de Tokuyasu.

La técnica de Tokuyasu permite el marcaje de antígenos específicos con anticuerpos en criosecciones y, por lo tanto, la detección posterior de proteínas en las células mediante ME. Este método es idóneo para marcar proteínas para ME de células ya que no se realiza deshidratación de la muestra ni tampoco su inclusión en resina, lo que permite una óptima

preservación de los epítomos. Los resultados obtenidos por este método en general, muestran una mayor conservación de las estructuras membranosas celulares y señales de inmunomarcaje más intensas que las que se obtienen en secciones de células incluidas en resina.

Para realizar este método, en cada experimento las células se crecen en dos placas p100 hasta tener una confluencia del 100%; una de las placas es infectada con VBUN a 1 UFP/célula durante 10 h.p.i. y la otra placa se usa como control. A continuación, se realiza una pre-fijación con PFA al 2% sin retirar el medio de cultivo durante 10 min a temperatura ambiente, después las células son fijadas con PFA 4% en Hepes 0,1M durante un tiempo mínimo de 1-2h a temperatura ambiente. Tras la fijación se realizan 3 lavados con PBS. Posteriormente se lleva a cabo una incubación con cloruro amónico (NH_4Cl) 50 mM para bloquear los grupos aldeídos libres durante 5 min a temperatura ambiente. A continuación, se añade 1,5 mL de gelatina al 1% en PBS y se recogen las células con un raspador y movimientos circulares, para no dañar las células mecánicamente. Tras la centrifugación se resuspenden en 1 mL de gelatina al 12% en PBS y se incuban 5 min a 37°C. Después de la incubación, las células se centrifugan, se descarta el sobrenadante y los pellets se solidifican en hielo durante 15 min. Posteriormente, el pellet se corta por la mitad y se incuba en sacarosa 2,1-2,3 M en hielo durante 15 min. A continuación, se cortan cubos de 1mm³ aproximadamente y se incuban durante toda la noche a 4°C en sacarosa 2,1-2,3 M. Los cubos de gelatina obtenidos se montan en soportes especiales y son congelados en nitrógeno líquido. Posteriormente, las muestras son talladas a -90°C utilizando un crio-ultra-microtomo Ultracut EM-UC6 (Leica) y una cuchilla de diamante. El tallado de las muestras consiste en realizar frentes cuadrados de 300 nm de lado aproximadamente. A continuación, se obtuvieron las criosecciones (50-70 nm) a -120°C con una cuchilla de diamante de 45° de inclinación especial para crio-microtomía. Las criosecciones se recogen con una mezcla de sacarosa/metilcelulosa (1:1) utilizando un *loop*, y se depositan en rejillas de cobre de 200 mesh con una capa de plástico *formvar* 0,5-0,8% y carbón que están sobre una placa en hielo.

Para el inmunomarcaje las rejillas se incuban en PBS en cámara húmeda a 37°C durante 25 min. Después se incuban con NH_4Cl 50mM 2 min en PBS y 5 min en BSA 1% en PBS para el bloqueo de las uniones inespecíficas. El anticuerpo primario anti-NSs (dilución 1:100) se incubó 1 h en BSA 1% en PBS. Se hicieron 5 lavados en BSA 0,1% en PBS y 5 lavados en BSA 1% en PBS. Después de los lavados las rejillas fueron incubadas 30 min con el anticuerpo secundario conjugado con oro coloidal de 10 nm de diámetro diluido en BSA 1% en PBS y se probaron dos

diluciones (1:50 y 1:100). A continuación, las rejillas fueron lavadas dos veces con BSA 1% en PBS y 3 veces con PBS. Después de los lavados las rejillas se incubaron 5 min en glutaraldehído 1%, se lavaron 9 veces con agua miliQ y se incubaron 5 min con acetato de uranilo y metilcelulosa (1:9) en hielo. Las rejillas fueron estudiadas mediante ME con un microscopio Jeol JEM 1011 a un voltaje de 100 kv.

6.- Microscopía correlativa óptica-electrónica (CLEM)

Las células Vero se crecieron en unas placas especiales con cuadrícula marcada en el cristal (placas p-36 MatTek® *Corporation Glass Bottom Cultured Dished*, P35G-2-14-CGRD).

A continuación, fueron infectadas con el virus recombinante rBUNGc-eGFP. Este virus lleva insertado en el segmento M la proteína verde fluorescente GFP fusionada a Gc, permitiendo detectar la glicoproteína Gc en el microscopio de fluorescencia y saber qué células se están infectando a tiempo real.

El estudio de las muestras en el microscopio Leica DMI6000B permitió la selección de las células con señal verde Gc-GFP y su localización en posiciones concretas de la placa. Para el estudio de dichas células mediante ME se fijaron, deshidrataron e incluyeron en resina siguiendo el mismo protocolo descrito en el apartado 5. En este caso la deshidratación se realizó con etanol, ya que los soportes utilizados eran de material plástico, el cual se deteriora con acetona. Tras la infiltración con resina epoxi EML-812 y la polimerización de las muestras en una estufa a 60°C, se separó el cristal de las placas p-36 MatTek® de los bloques de resina con choques térmicos usando nitrógeno líquido y agua tibia alternativamente. Las células de interés se localizan en la resina gracias a que las letras y números del cristal quedan marcadas en la resina. Una vez localizada la zona de interés, se talló el área y se obtuvieron secciones ultrafinas (50-70nm) en el Ultramicrotomo EM-UC6 (Leica). Las secciones se tiñeron con acetato de uranilo saturado durante 20 min, y con citrato de plomo durante 2 min siguiendo el protocolo habitual. Finalmente, las rejillas fueron estudiadas en un microscopio electrónico Jeol JEM 1011.

Resultados

1.- Descripción de la factoría de VBUN en células Vero.

1.1.- Estudio de la infección mediante microscopía de fluorescencia y microscopía electrónica

Para estudiar el ciclo vital de VBUN en células Vero, se han realizado estudios de inmunofluorescencia (IF) mediante el marcaje con anticuerpos anti-Gc, glicoproteína de la envuelta viral, anti-N, proteína de la núcleo-cápside y Gigantina, glicoproteína estructural de la membrana de la región *cis-media* del Golgi, que es el compartimento usado por el virus para ensamblar su factoría. La factoría viral también ha sido estudiada mediante ME. Para ello se obtuvieron secciones ultrafinas orientadas paralelas de monocapas celulares, lo cual nos permite saber en qué zona de la célula y en qué proporción se encuentran las diferentes estructuras estudiadas. También nos permite correlacionar las imágenes obtenidas en las diferentes secciones con las imágenes de MF (Figuras 1 y 2).

Para estudiar la progresión de la infección en las monocapas de células Vero, las células se infectaron a 1 UFP/célula y a diferentes tiempos de post-infección. A tiempos iniciales de post-infección, concretamente a 4 h.p.i. (Figura 1 A) cuando se ha producido tan sólo un ciclo de replicación (Salanueva y cols., 2003), encontramos <5% de células infectadas mediante MF. En las escasas células que muestran signos de infección, encontramos una factoría más agrupada y un Golgi fragmentado pero no disperso. El núcleo de estas células (Figura 1 A, imagen principal, flechas) se encuentra ligeramente alterado, con una cromatina más homogéneamente distribuida que en los núcleos de las células no infectadas (Figura 1 A, recuadro). A 10 h.p.i. encontramos en torno a un 90% de células infectadas (Figura 1 B), en las que el Golgi se ha dispersado por toda la célula formando numerosos fragmentos distribuidos de forma uniforme. Se observan también cambios drásticos en los núcleos celulares en los que el nucléolo desaparece. Cuando las células son estudiadas mediante ME se observan igualmente diferencias significativas según el tiempo de post-infección. Las células infectadas a 4 h.p.i. aún no han sufrido un deterioro importante, pero ya se puede apreciar la formación de la factoría viral, un Golgi fragmentado pero no disperso y el reclutamiento discreto de orgánulos (Figura 1 C y D). En las células infectadas a 10 h.p.i. el citoplasma se encuentra más “vacío”, los orgánulos presentan alteraciones y se observa un mayor número de estructuras virales (Figura 1 E y F). Estos cambios están asociados a una mayor producción de virus a tiempos de post-infección largos. Si tenemos en cuenta la curva de crecimiento (Figura 1 G), a 10 h.p.i. tenemos en torno a dos órdenes de magnitud más producción viral que a 4 h.p.i.

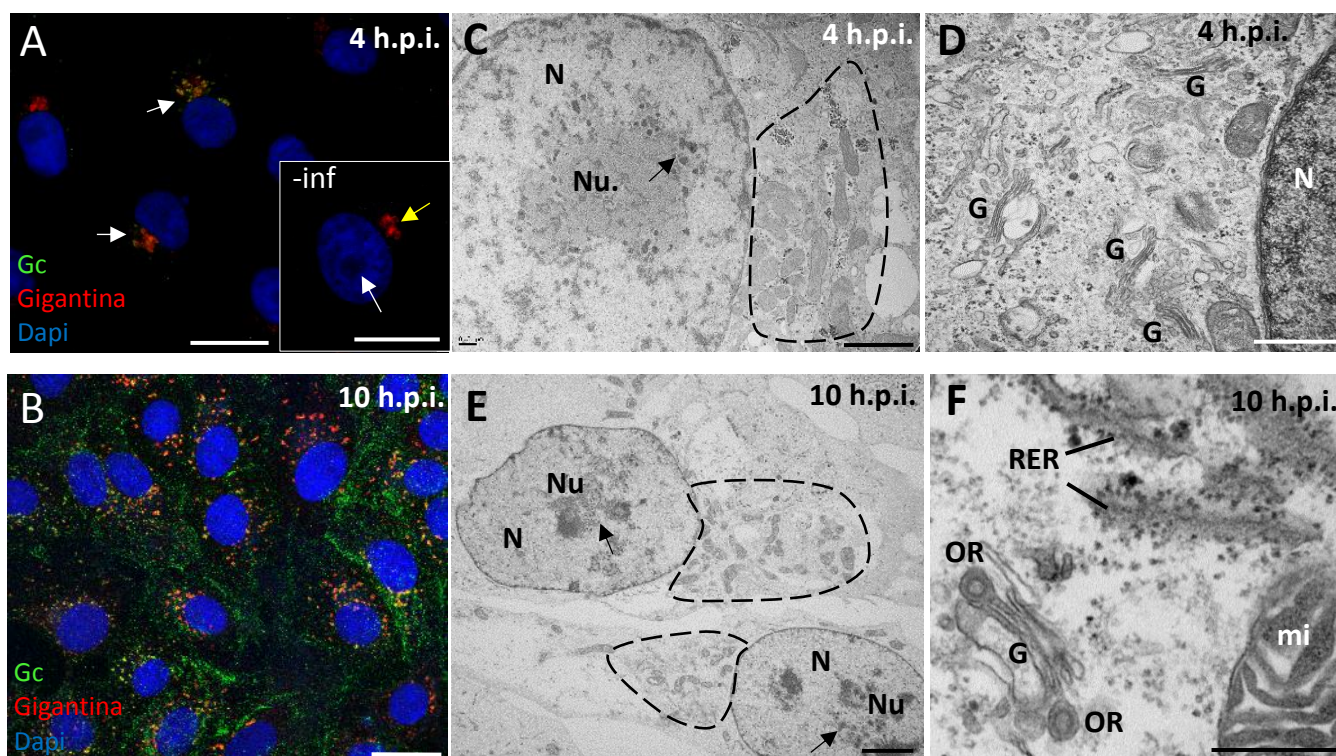
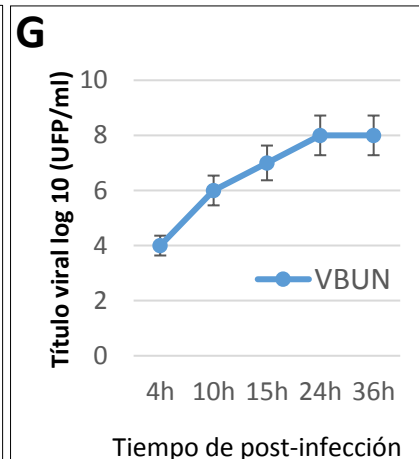


Figura 1. MF y ME de células Vero infectadas a diferentes tiempos de post-infección.

(A y B) Células Vero infectadas con VBUN a 1 UFP/célula a 4 h.p.i. y a 10 h.p.i., respectivamente. Proyección de imágenes de microscopía confocal. Marcaje del Golgi (anti-Gigantina, rojo), del núcleo (Dapi, azul) y de Gc (anti-Gc, verde). (A) Células infectadas a 4 h.p.i. Señales de Gc y Gigantina agrupadas en escasas células (flechas); Recuadro: célula sin infectar, nucléolo presente (flecha blanca) y señal de Golgi agrupada (flecha amarilla). (B) Células infectadas a 10 h.p.i. Señal de Gc y Gigantina en prácticamente todas las células con un patrón disperso por toda la célula. (C-F) ME de secciones ultrafinas orientadas de células Vero infectadas con VBUN a 1 UFP/célula a 4 h.p.i. y 10 h.p.i. (C y D) Células infectadas a 4 h.p.i. (C) Se observa reclutamiento de orgánulos (área delimitada por línea punteada) y una leve modificación del nucléolo (Nu). (D) Imagen a mayor magnificación, se observa citoplasma poco deteriorado con un Golgi (G) fragmentado. (E y F) Células infectadas a 10 h.p.i. (E) Factorías virales bien definidas (área delimitada por línea punteada) núcleos y nucléolos alterados (flechas). (F) La imagen a mayor magnificación muestra un citoplasma más vacío y componentes de una factoría viral; OR: Orgánulo de replicación; G: Golgi; RER: retículo endoplásmico rugoso; mi: mitocondria. (G) Curva de crecimiento de VBUN. Los datos mostrados son representativos de al menos tres experimentos independientes. Barras: 25 μ m en A y B; 0,8 μ m en C-E; 0,4 μ m en F.



En la factoría viral de células Vero infectadas, encontramos todas las estructuras ya descritas en trabajos anteriores en los que se estudió la infección de VBUN en otras líneas celulares (BHK-21, MRC-5, Hep2) (Salanueva y cols., 2003; Novoa y cols., 2005b; Fontana y cols., 2008; Sáenz-Sánchez y Risco, 2013; Fernández de Castro y cols., 2014). En células Vero son numerosas las alteraciones sufridas en los diferentes orgánulos a causa de la infección por VBUN (Figura 2 A y B, célula infectada: C-I, célula no infectada: J y K). Cuando la factoría se ensambla en las

células infectadas, observamos una agrupación de mitocondrias y de retículo endoplásmico alrededor de los ORs (Figura 2 C y D). El aparato de Golgi se encuentra fragmentado y según el tiempo de post-infección más o menos disperso (Figura 2 D, E y F), en comparación con las células no infectadas, donde el Golgi permanece agrupado y sin fragmentar (Figura 2 J y K). Dentro de la factoría viral, encontramos según la orientación que tengan las secciones ultrafinas, las esférulas o dominios globulares de los ORs que albergan los complejos replicativos (CRs) (Figura 2 D y F) y los dominios tubulares de los ORs (Figura 2 G recuadro). En cuanto a las partículas virales, encontramos virus intracelulares inmaduros (vii), virus intracelulares maduros (vim) y virus extracelulares (ve) (Figura 2 G).

Las mitocondrias en las células infectadas están alteradas, son más densas, se encuentran hinchadas y poseen alteraciones en las crestas mitocondriales (Figura 2 H) con respecto a las encontradas en células no infectadas (Figura 2 K, recuadro).

Por primera vez se describen cambios estructurales producidos por VBUN en el núcleo. Mediante MF en células sin infectar, el nucléolo es visible y la cromatina del núcleo tiene una distribución homogénea (Figura 2 J). En la célula infectada se observa un núcleo con la cromatina condensada por zonas y el nucléolo desaparece (Figura 2 E). Cuando estas células se estudian mediante ME, en células infectadas se observa un núcleo con un nucléolo disgregado con presencia de cuerpos densos pequeños (Figura 2 C flechas e I), a diferencia de una célula no infectada, donde se observa un núcleo con un nucléolo presente y sin alteraciones morfológicas (Figura 2 K).

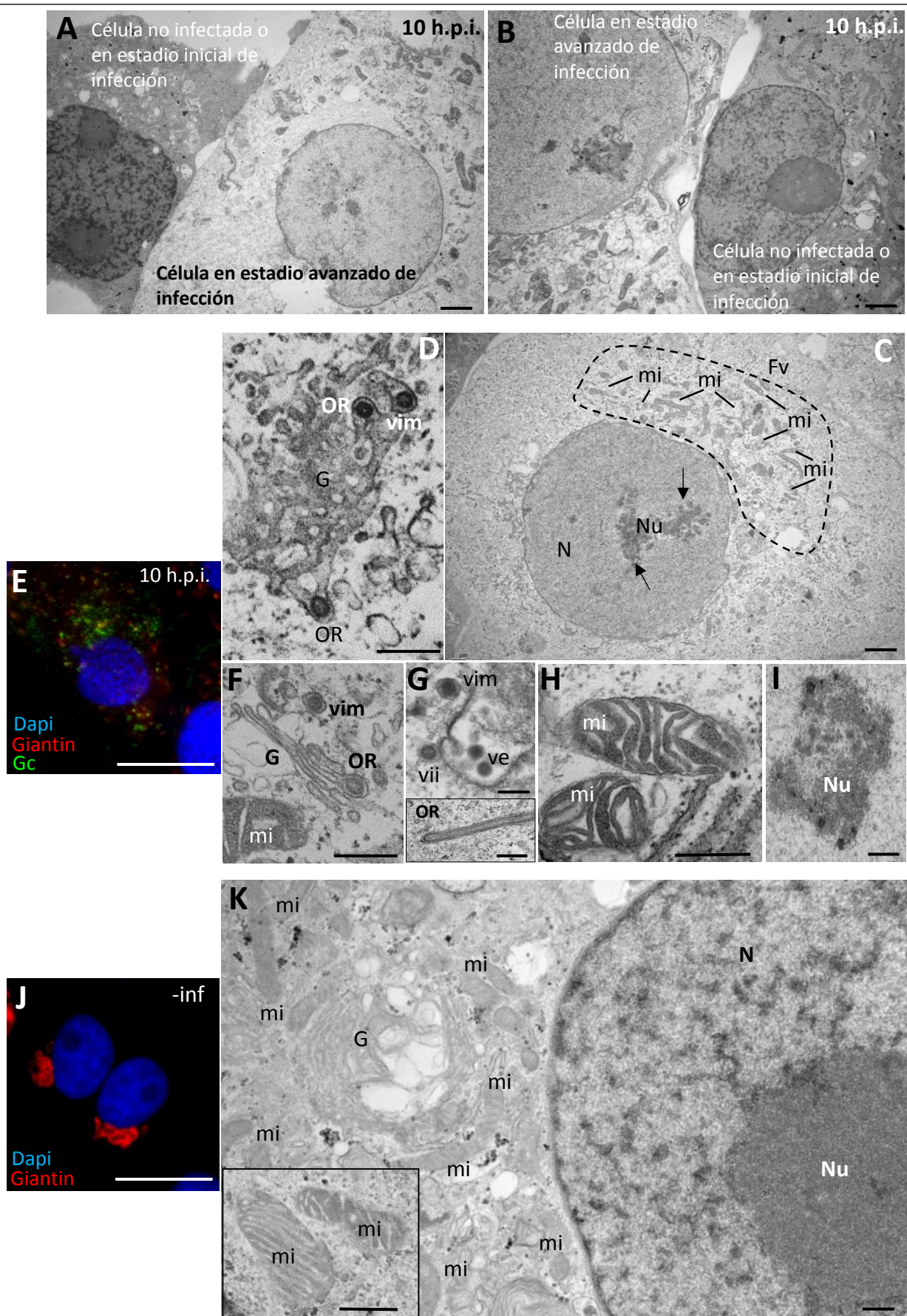


Figura 2. Caracterización de la factoría viral de VBUN en células Vero mediante microscopía de fluorescencia y microscopía electrónica.

(A y B) Células Vero infectadas con VBUN a 1 UFP/célula a 10 h.p.i. Mediante ME se pueden apreciar las distintas morfologías de las células en un estado avanzado de infección frente a las infectadas en un estadio muy inicial de infección. (C-I) Célula Vero infectada con VBUN a 1 UFP/célula a 10 h.p.i. (C,D,F,G,H,I) ME obtenida de secciones ultrafinas orientadas provenientes de células Vero infectadas con VBUN a 1 UFP/célula a 10 h.p.i. (C) ME de la factoría viral (Fv) con reclutamiento de orgánulos y alteración del núcleo, nucléolo (flechas) y del citoplasma. (D) ORs y vim. (E) Proyección de imágenes de microscopía confocal. Marcaje del Golgi (anti-Gigantina, rojo), del núcleo (Dapi, azul) y de la proteína viral Gc (anti-Gc, verde). (F) ME de un dominio globular o esférula de un OR formado en el Golgi. (G) Virus intracelulares inmaduros (vii), virus intracelulares maduros (vim), virus extracelulares (ve). (H) Mitocondrias alteradas. (I) Imagen a mayor magnificación de un nucléolo alterado con presencia de cuerpos densos. (J-K) Estructuras celulares en células Vero no infectadas. (J) Proyección de imágenes de microscopía confocal. Marcaje del Golgi (anti-Gigantina, rojo) y del núcleo (Dapi, azul). (K) ME obtenida de secciones ultrafinas orientadas provenientes de células Vero sin infectar. Se observa un núcleo con un nucléolo normal (Nu) y un Golgi (G) agrupado y sin alteraciones. Mitocondrias sin alteraciones a mayor resolución (recuadro).
Barras: 2 µm en A-C; 0,4 µm en (D,F,G,H,I y K); 25 µm en E y J.

VBUN induce cambios drásticos en las células Vero infectadas a tiempos largos de post-infección. La formación de las factorías virales implica una alteración morfológica en toda la célula, incluida la modificación de numerosos orgánulos, como ocurre con el aparato de Golgi, las mitocondrias, el núcleo y el nucléolo.

Aparentemente los vim de VBUN en células Vero se encuentran mayoritariamente de forma individual o en parejas en el interior de vesículas (Figura 3 A). Para tener un estudio completo, se infectaron células Vero con VBUN a 1UFP/célula a 10 h.p.i. y se obtuvieron secciones orientadas paralelas de las monocapas de células, estudiándose por ME todas las células con signos de infección. Se estudiaron un total de 60 células donde observamos que, aparte de encontrar los vim de forma individual o en parejas (Figura 3 A, puntas de flecha), se encontraron agrupaciones de virus en estructuras vacuolares en un 30% de las células (Figura 3 B-F, flechas). Los vim, se acumulan principalmente en la zona basal de las células y en ocasiones se observan las estructuras vacuolares con virus cerca de la membrana basal (Figura 3 B). En la zona basal de células Vero y como se ha descrito para células BHK-21 (Sanz-Sánchez y Risco, 2013), también parece producirse la salida de VBUN, ya que encontramos un gran número de virus extracelulares asociados a prolongaciones y fibras extracelulares (Figura 3 G-I, flechas rojas).

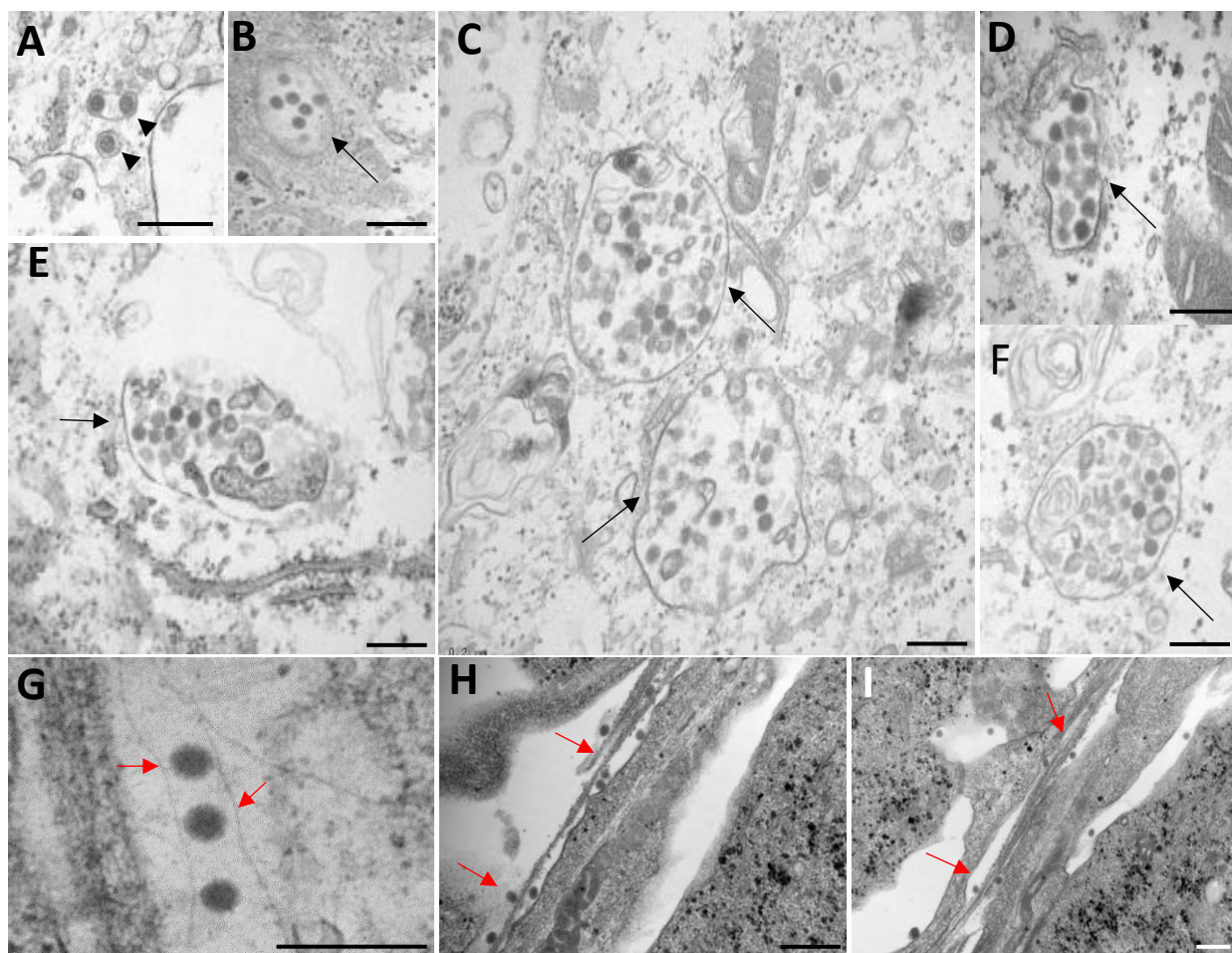


Figura 3. Partículas virales de VBUN en células Vero.

ME de secciones ultrafinas orientadas de células Vero infectadas con VBUN a 1 UFP/célula a 10 h.p.i. (A). Las puntas de flecha señalan vim individuales y en parejas. (B-F) Las flechas muestran los grupos de virus en estructuras vacuolares. (G-I) ME de secciones basales donde se observan virus asociados a prolongaciones celulares y fibras extracelulares (flechas rojas). Barras: 0,4 μ m.

1.2.- Estructuras virales ensambladas por rBUNGc-eGFP en células Vero visualizadas mediante microscopía de células vivas y microscopía correlativa óptica-electrónica.

Para estudiar el posible origen de las estructuras vacuolares con virus, se realizaron estudios en células vivas. Estos mostraron que en células Vero infectadas con rBUNGc-eGFP, un virus recombinante que contiene la proteína viral Gc marcada con eGFP (Shi X y cols., 2010), se formaban estructuras globulares grandes (3 a 5 μ m) de señal verde en el citoplasma a tiempos largos de post-infección (16 h.p.i.). La video microscopía reveló que estas estructuras fluorescentes podían ser transmitidas de célula a célula (Figura 4 A) secuencia completa en Video R-1 y R-2 A y B, o incorporadas por la célula cuando se encontraban en el medio extracelular (Figura 4 B; Video R-3 A y B). No se observó que estas estructuras fueran excretadas por la célula, salvo cuando se producía la muerte celular (Figura 4 C; Video R-4 A y B). También se observó que en los tiempos de post-infección estudiados en un 30% de las

células que incorporaban estas estructuras se ensamblaban las factorías y se producía replicación viral (Figura 4 D; Video R-5 A y B y R-6).

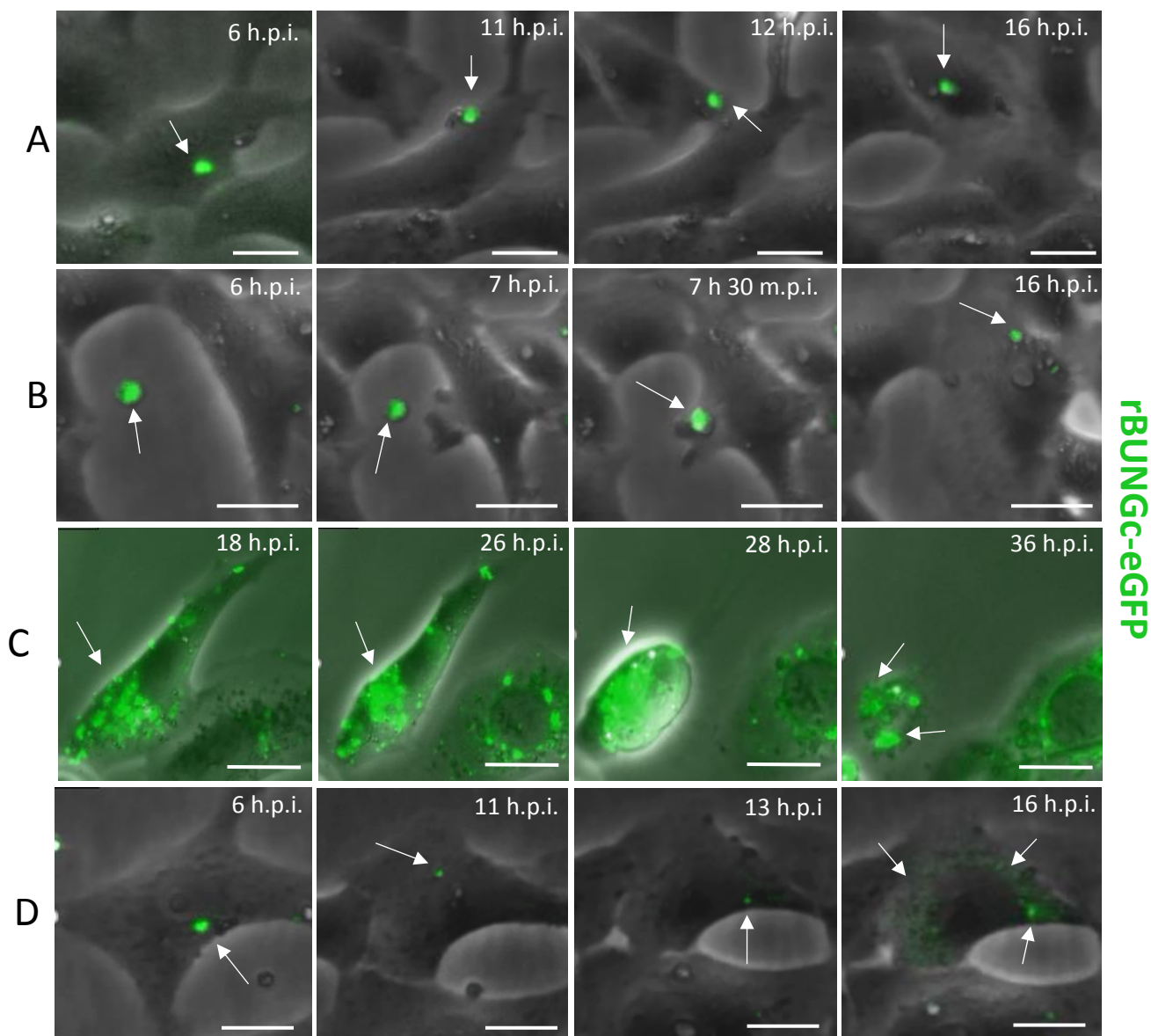


Figura 4. Estudio *in vivo* de las estructuras globulares fluorescentes en células Vero infectadas con rBUNGc-eGFP.

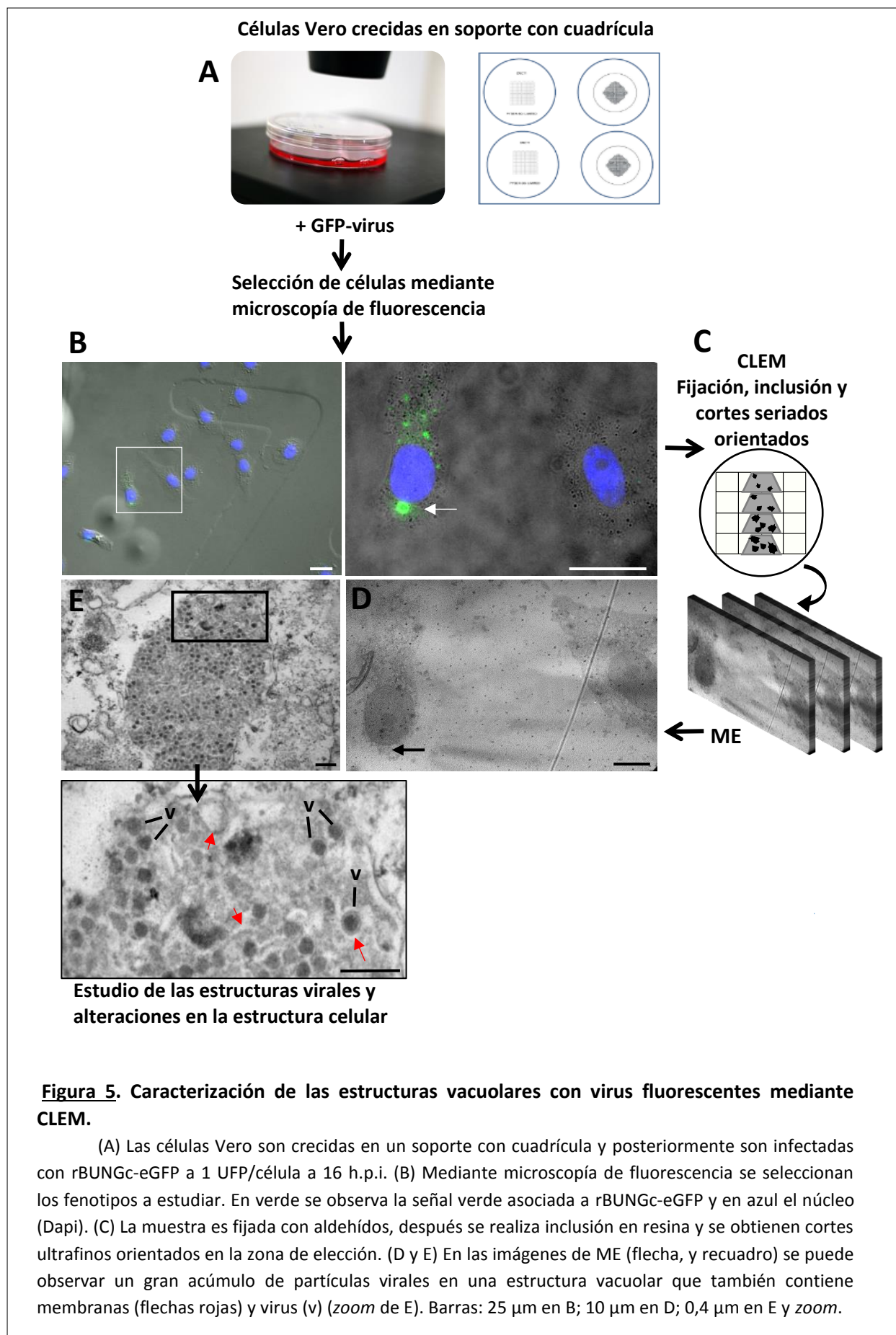
Células Vero infectadas a 3 UFP/célula con rBUNGc-eGFP, (A, B y D) de 0 a 16 h.p.i. y C de 16 a 40 h.p.i. (A) Se observa como una estructura globular es transportada de una célula a otra; la célula receptora adquiere la estructura mediante una proyección del citoplasma (flechas). (B) Una estructura globular que se encuentra en el medio extracelular es incorporada en una célula que emite una proyección y atrapa la estructura (flechas). (C) Las estructuras globulares quedan expuestas en el medio extracelular tras la muerte celular (flechas). (D) Se observa una estructura globular siendo transportada por todo el citoplasma de una célula; la estructura se disgrega y al poco tiempo se observa señal de infección (flechas). Barras: 25 µm.

Para determinar a qué correspondían las estructuras globulares fluorescentes, y ver si podrían ser las mismas encontradas en los estudios de ME (Figura 3), se procedió a realizar estudios de microscopía correlativa óptica-electrónica, en inglés “*Correlative Light and Electron Microscopy*” (CLEM). Con esta técnica podemos estudiar las estructuras observadas en células vivas o fijadas mediante MF y posteriormente analizarlas en detalle mediante ME.

Se realizaron un total de 5 experimentos de CLEM y se estudiaron un total de 18 células. Un resumen de la estrategia experimental con una de las células que mostró un fenotipo compatible con las estructuras globulares fluorescentes se representa en la Figura 5.

Para la realización de la CLEM, las células Vero fueron crecidas sobre un soporte de cristal con una rejilla marcada con números y se empleó el virus fluorescente rBUNGc-eGFP.

Se infectaron las células a 1 UFP/célula a 15 h.p.i. y mediante MF se seleccionaron las células de interés que posteriormente fueron fijadas y procesadas para ME (Figura 5 A y B). Dado que los números de la rejilla quedan marcados en la resina, es posible localizar las estructuras detectadas mediante MF-contraste de fases y posteriormente estudiarlas por ME (Figura 5 C y D). Se realizaron secciones seriadas paralelas de las células que presentaban estructuras globulares con señal verde. Cuando se estudiaron las estructuras en detalle, se observó que eran similares a las encontradas en el estudio anterior de ME (Figura 3). Se encontró una gran cantidad de virus almacenados en el interior de estructuras vacuolares, donde se pueden encontrar tanto virus maduros como inmaduros de diferentes tamaños, así como estructuras membranosas (Figura 5 E). Algunas de estas estructura vacuolares con virus, resultaban claramente mayores en tamaño ($\sim 1,8 \mu\text{m}$) (Figura 5 E) frente a las observadas en el estudio anterior ($\sim 0,5 \mu\text{m}$) (Figura 3). Los grandes acúmulos de partículas virales detectados en células Vero infectadas con VBUN no habían sido observados en otros tipos celulares.



Para valorar la posible participación del *trans*-Golgi network en la formación de las estructuras vacuolares con virus, se marcó el compartimento TGN con anti-TGN-46 en ensayos de IF. Se realizaron también marcajes de la zona *cis*/*media*-Golgi con anti-Gigantina. Las células Vero fueron infectadas a 1 UFP/célula a 10 h.p.i. con VBUN. Se observó que Gc colocalizaba con TGN-46 en estructuras de varios tamaños en un 90% de las células (Figura 6 A y B, flechas), cuando se realizó el marcaje con Gigantina se obtuvo una colocalización en el 87% de las células (Figura 6 C, flecha).

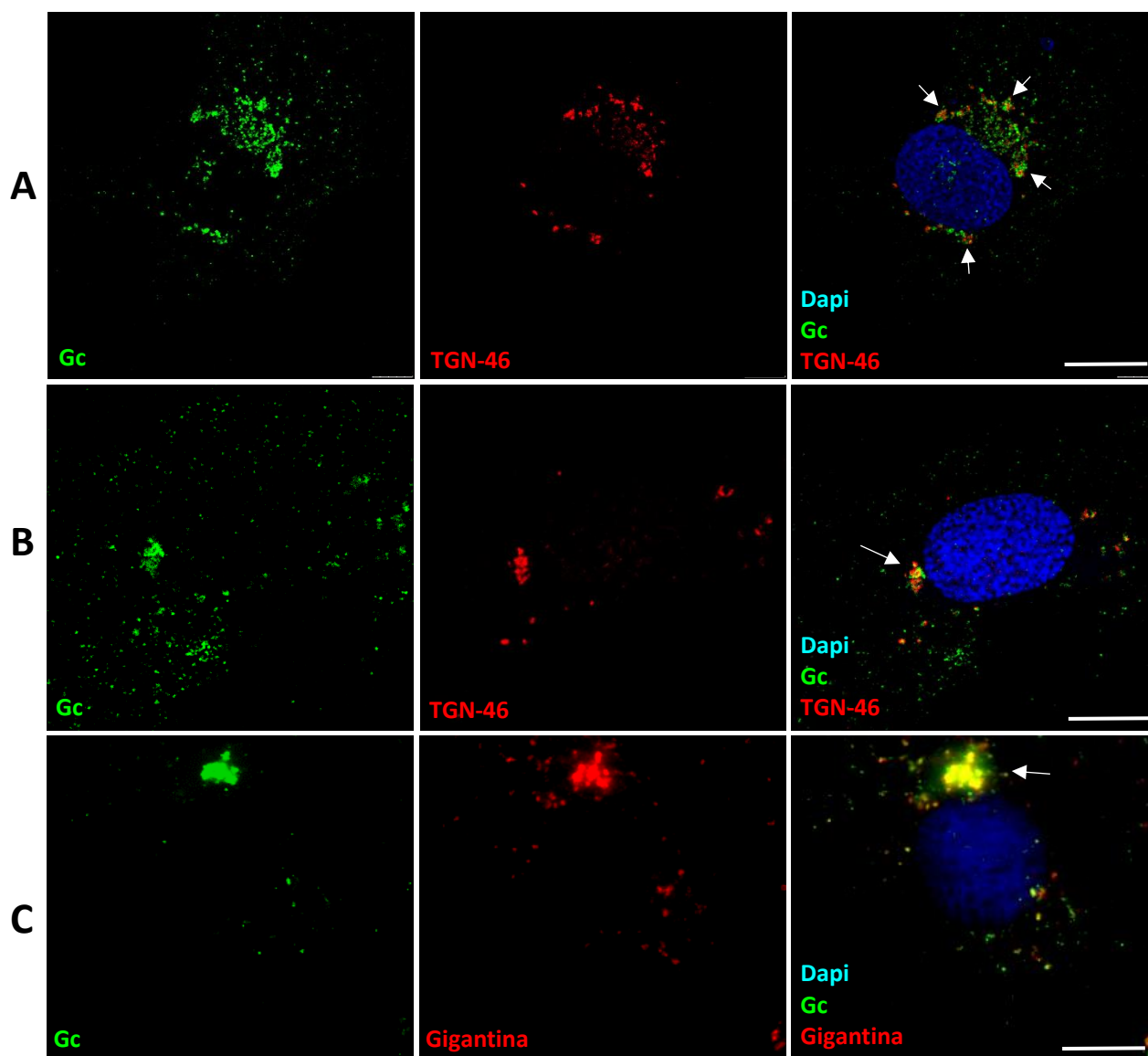


Figura 6. La proteína viral Gc se localiza en la zona *cis*/*media* del Golgi y en el TGN

(A - C) Células Vero infectadas con VBUN a 1 UFP/célula a 10 h.p.i. Proyección de imágenes de microscopía confocal. (A y B) Marcaje del compartimento TGN con anti-TGN-46 (rojo), del núcleo (Dapi, azul) y de Gc con anti-Gc (verde). (C) Marcaje del compartimento *cis*-Golgi con anti-Gigantina (rojo), del núcleo (Dapi, azul) y de Gc con anti-Gc (verde). Los acúmulos de señal verde correspondientes a Gc, colocalizan tanto con TGN-46 como con Gigantina (flechas). Barras: 15 μ m.

Considerando la morfología de las estructuras vacuolares llenas de virus (Figura 3) y los resultados de IF (Figura 6) se puede hipotetizar que los virus se acumulan en el TGN antes de su secreción.

1.3.- Caracterización de los cambios en la estructura nuclear causados por la infección de VBUN.

Como se ha mostrado en la caracterización morfológica de la célula Vero infectada por VBUN, el núcleo sufre diversas modificaciones estructurales a causa de la infección (Figura 2). Mediante MF se pueden observar detalles de los cambios en la cromatina del núcleo que parece más condensada por zonas (Figura 7 A y B). En estudios con células vivas, infectadas por rBUNGc-eGFP, observamos que las células que presentan señal verde, tienen un núcleo sin nucléolo visible (Figura 7 C). Cuando estas células son estudiadas mediante ME, encontramos diferentes estadios, desde células recién infectadas donde la alteración es menor (Figura 7 D), células en un estadio más avanzado, donde el nucléolo se encuentra ya más desorganizado (Figura 7 E y F) y en etapas más tardías de infección donde el núcleo no tiene un nucléolo visible (Figura 7 G).

Otro evento en el que nos podemos encontrar una alteración del núcleo es la mitosis celular. Para mostrar que las modificaciones del núcleo durante la infección viral, no correspondían con una fase inicial de la mitosis, se realizó un amplio estudio de ME de células sin infectar, y que se encontraban en distintos estadios de división. Las condiciones de crecimiento usadas para estos estudios, son las mismas empleadas para el resto de estudios, salvo que se incrementa la concentración del 2% al 10% de FBS. De esta manera tenemos en torno a un 4% - 6% de células en división. Se pudieron observar prácticamente todas las fases de la mitosis. En las fases iniciales, aún está presente el nucléolo (Figura 7 I y J), que posteriormente desaparece y sólo son visibles los cromosomas (Figura 7 K). Se pudo evidenciar que, en ninguna de las fases tempranas de la mitosis, en las que el núcleo y nucléolo van sufriendo diferentes modificaciones en su contenido, como cuando la cromatina comienza a condensarse y espiralizarse para formar los cromosomas (Figura 7 H-J), se observan cambios comparables con los encontrados en los núcleos y nucléolos de las células infectadas (Figura 7 D-G). Estos datos demuestran que el virus es capaz de alterar el núcleo y nucléolo de forma discreta, en etapas muy tempranas en el ciclo vital, hasta conseguir una desorganización total a tiempos mayores de post-infección. La desorganización del nucléolo va pareja al deterioro citoplasmático, así como a la aparición de un mayor número de estructuras virales.

Los cambios descritos en el núcleo y nucléolo son por tanto marcadores fiables de la infección de VBUN en células Vero. Sólo una de las seis proteínas de VBUN, la proteína NSs, ha sido localizada dentro del núcleo de células infectadas (Yadani FZ y cols., 1999; Weber F y cols., 2001). Por ello se estudió a continuación el posible papel de NSs en los cambios nucleares durante la infección de VBUN en células Vero.

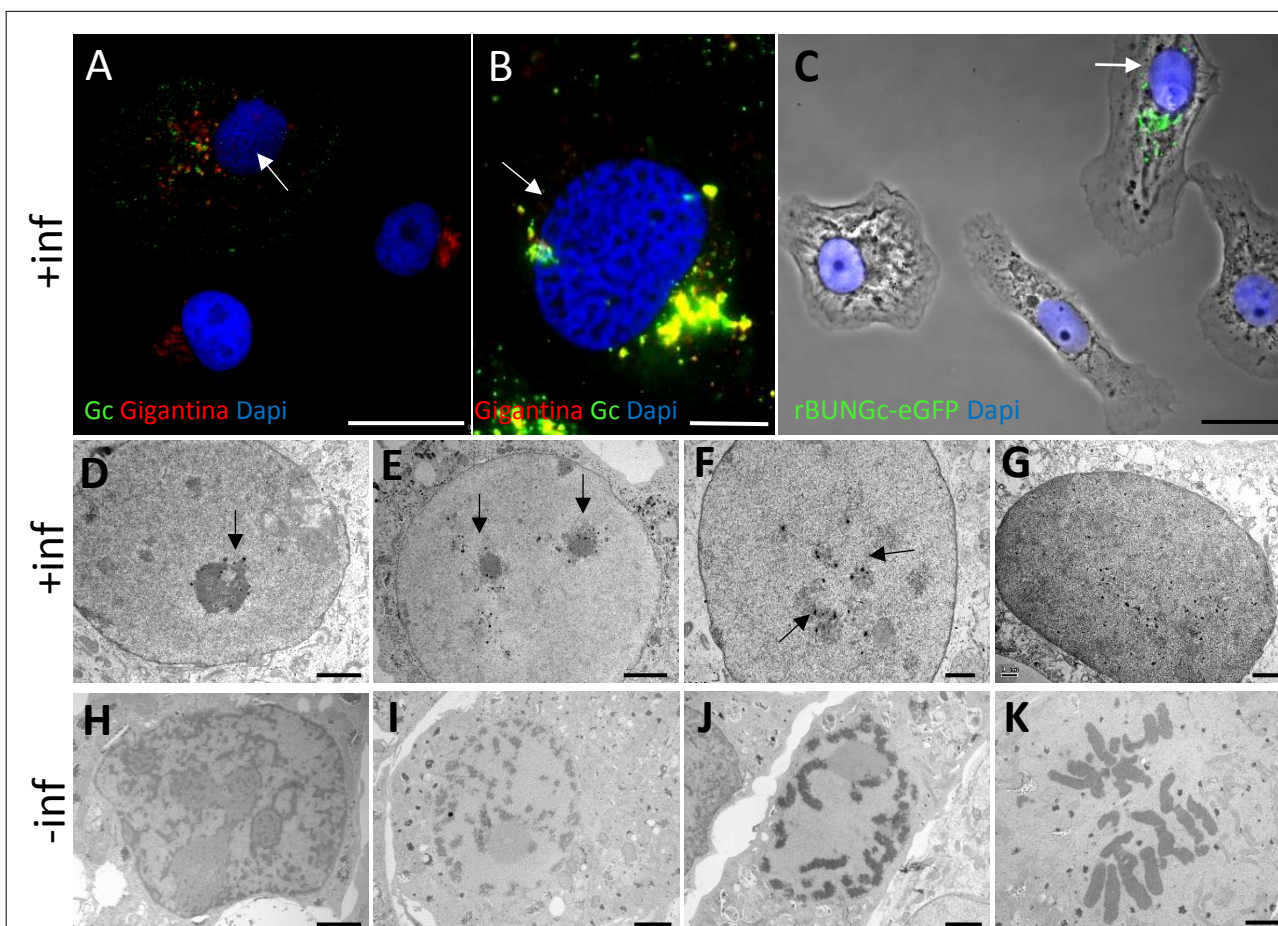


Figura 7 Evolución del núcleo en células Vero infectadas por VBUN.

(A-B) Células Vero infectadas con VBUN a 1 UFP/célula a 10 h.p.i. Proyección de imágenes de microscopía confocal. Marcaje de la proteína viral Gc (anti-Gc, verde), del núcleo (Dapi, azul) y del Golgi (anti-Gigantina, rojo). (A) Célula infectada donde no se observa el nucléolo (flecha). (B) Zoom del núcleo de otra célula infectada mostrando cromatina condensada por zonas y sin nucléolo. (C) Imagen *in vivo* de células Vero infectadas con rBUNGc-eGFP a 1 UFP/célula a 16 h.p.i. procedente de video-microscopía. Señal verde asociada a rBUNGc-eGFP y azul asociada al núcleo (Dapi). El nucléolo no es visible en las células con señal verde (flecha). (D-G) ME de secciones ultrafinas orientadas a diferentes alturas de células Vero infectadas con VBUN a 1 UFP/célula a 10 h.p.i. (D) Nucléolo ligeramente alterado con la presencia de pequeños acúmulos densos (flecha). (E y F) Células en estadios de infección más avanzado, núcleos con nucléolos disgregados con pequeños acúmulos densos (flechas). (G) Célula en estado muy avanzado de infección, núcleo sin nucléolo. (H-K) ME de secciones ultrafinas orientadas a diferentes alturas de células Vero crecidas con 10% FBS, sin infectar y en diferentes estadios de la división celular. Se muestran las diferentes fases de condensación de la cromatina y formación y migración de los cromosomas, características del comienzo de la mitosis (J y K). Barras: 25 μ m en A y C; 7,5 μ m en B; 2 μ m en D a K.

1.4.- Estudio de la proteína NSs en células Vero.

Como se ha descrito en la introducción, NSs es el principal factor de virulencia en bunyavirus, y ha sido localizada en el núcleo de células infectadas (Yadani FZ y cols., 1999; Gouzil J y cols., 2017), lo que nos hizo pensar que podría estar implicada en los cambios estructurales sufridos en el núcleo durante la infección.

1.4.1.- Localización de NSs en células Vero.

Para estudiar la localización de NSs mediante MF, se infectaron células Vero con VBUN a 1 UFP/célula a 10 h.p.i. y se marcaron con anticuerpos anti-NSs, anti-Gc y sondas fluorescentes. En estos estudios iniciales se obtuvo un marcaje débil de NSs, con mucho fondo inespecífico, no encontrándose una señal clara ni en el citoplasma ni en el núcleo. Sin embargo, Gc estaba presente en el 90% de las células. Dichos resultados apuntan a una mala sensibilidad o una baja especificidad del anticuerpo. Para verificar que el anticuerpo anti-NSs era capaz de unirse a NSs, se realizaron estudios de *western blot* (Figura 8). Se obtuvo una buena señal del anticuerpo anti-NSs, por lo que, una vez demostrada su especificidad, se procedió a solucionar posibles problemas procedentes de la preparación de las muestras.

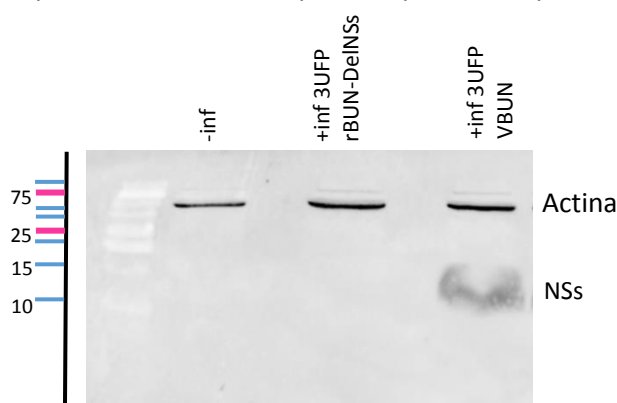


Figura 8 Las células Vero fueron infectadas a 3 UFP/célula a 10 h.p.i. con VBUN o con el mutante de delección que carece de NSs (rBUN-DelNSs). Como control adicional de especificidad, se incluyeron también células Vero no infectadas. Como control de carga se usó actina.

Figura 8 Detección de NSs mediante *western blot*.

En primer lugar, para reducir el fondo inespecífico del anti-NSs, se realizó una inmunoabsorción del anticuerpo. Para ello se crecieron células Vero sin infectar, posteriormente fueron fijadas con paraformaldehído al 4% y permeabilizadas con saponina. Se les añadió el anticuerpo anti-NSs y se dejaron incubando toda la noche a 4°C. De este modo se eliminan las uniones inespecíficas que pueda tener el anticuerpo. Se recogió el sobrenadante y se usó como anticuerpo primario. Un segundo cambio en el protocolo de marcaje consistió en fijar las células con metanol, lo que permite una mayor permeabilización del núcleo, así como el tratamiento de las muestras con NP-40, un detergente frecuentemente usado para abrir poros en todas las membranas celulares, incluida la nuclear. Para reforzar esta

permeabilización se usó también una mayor concentración de saponina, otro detergente que permite el paso de anticuerpos a través de la membrana plasmática. De nuevo las células Vero fueron infectadas en las mismas condiciones anteriores y se aplicaron estos cambios descritos en el protocolo de MF. Con este nuevo protocolo (Figura 9) se estudiaron un total de 500 células. El anticuerpo anti-NSs no produjo un fondo inespecífico significativo en células Vero sin infectar (Figura 9 A). En células infectadas se observó el patrón típico de Gc en aproximadamente un 90% de las células y en un 4% de las células que tenían señal de Gc, se observó señal de NSs a modo de punteado denso en el núcleo, en el cual, no se distinguía la presencia del nucléolo (Figura 9 B y C). A tiempos más tardíos (24 h.p.i.), se pudo observar señal de NSs en el citoplasma. Dicha señal no colocalizaba con Gc (resultados no mostrados).

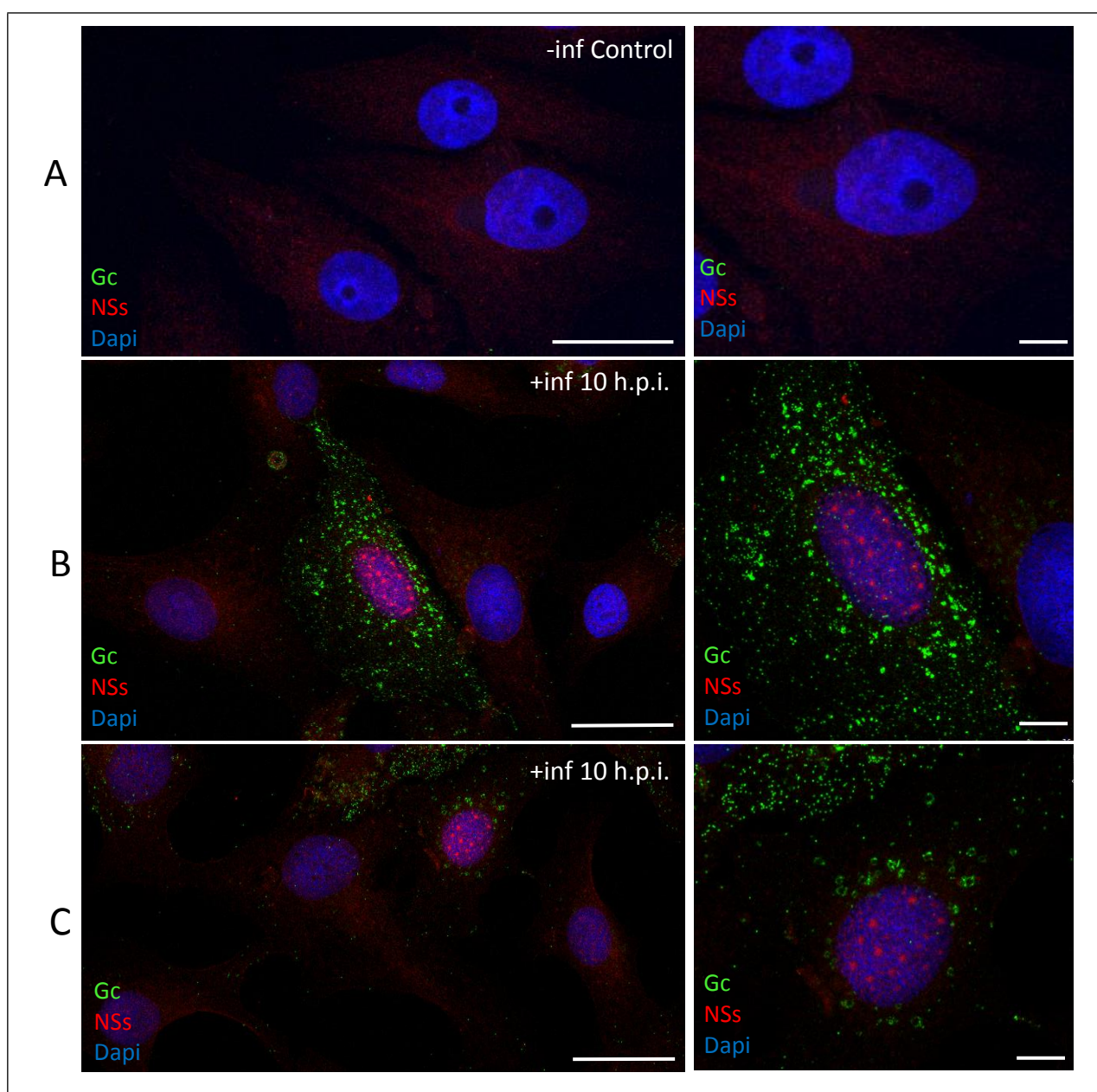


Figura 9. Marcaje de NSs en células fijadas con metanol y marcadas con anti-NSs después de inmunoabsorción.

(A-C) Proyección total de imágenes de microscopía confocal, a la izquierda imágenes de menor magnificación y a la derecha imagen de mayor magnificación de las células de interés. Marcaje de la proteína viral NSs (anti-NSs, rojo), del núcleo (Dapi, azul) y de Gc (anti-Gc, verde). Antes de la incubación con anticuerpos, las muestras fueron fijadas con metanol y tratadas con NP40 y saponina. (A) Células Vero sin infectar incubadas con los anticuerpos. No se obtuvo señal de Gc ni de NSs. (B y C) Células Vero infectadas con VBUN a 1 UFP/célula a 10 h.p.i. El marcaje para NSs muestra un patrón punteado en el núcleo, Gc; aparece distribuida por todo el citoplasma. Barras: 25 μ m en imagen principal en A-C; 7,5 μ m en las magnificaciones mayores en A-C.

Según la bibliografía, la dificultad para localizar la proteína NSs en ensayos de IF podría atribuirse a su naturaleza inestable. Esta inestabilidad a menudo se debe a la presencia de dominios desordenados, principalmente en los extremos N y C-terminales, pero también en el dominio central (Gouzil J y cols., 2017). También se ha observado que en las células infectadas, la proteína NSs de VBUN es objeto de degradación mediada por proteosomas (van Knippenberg I y cols., 2013) por lo que su presencia fugaz hace que sea más difícil detectarla mediante técnicas de IF. Para resolver esta limitación y conseguir una señal más intensa, se trataron las células con el inhibidor del proteosoma MG-132. Los proteosomas son complejos proteicos encargados de la degradación de proteínas que se encuentran en el citoplasma celular. MG-132 es un péptido aldehído capaz de inhibir el proteosoma (Han YH y cols., 2009) e inducir autofagia (Ding WX y cols., 2007a,b). También se sabe que son numerosos los virus que modifican la vía ubiquitina-proteosoma para favorecer su replicación y algunos virus incluso codifican proteínas virales que pueden ubiquitinar o desubiquitinar proteínas (Gao G and Luo H, 2006; Isaacson MK y Ploegh HL, 2009; Barrado-Gil L y cols., 2017).

Para estudiar el efecto de este inhibidor, las células Vero fueron infectadas con VBUN a 2 UFP/célula y a las 5 h.p.i. se añadió MG-132 a una concentración de 10 nM, fijando posteriormente a 10 h.p.i. Es preferible no añadir el inhibidor a un tiempo de post-infección de 0 h.p.i. ya que, de este modo, evitaremos provocar cualquier alteración temprana de alguno de los procesos celulares mediados por proteosomas, o algún proceso utilizado por el virus para su replicación, lo que podría afectar a la infectividad de VBUN. En este sentido se sabe que la degradación proteosómica está implicada en la regulación de la expresión génica, del ciclo celular o el control de las respuestas al estrés oxidativo. Cuando las muestras tratadas con MG-132 se estudiaron mediante MF usando nuevamente anti-Gc y anti-NSs, se encontró que a diferencia de lo observado en células no tratadas con MG-132 (Figura 10 A), en células tratadas

con el inhibidor se detectó señal de NSs en un 40% de las células con señal para Gc. Ésta de nuevo se encontró en un 90% de las células infectadas. Aparte de la señal de NSs encontrada en el núcleo, también se encontró señal en forma de pequeños acúmulos en el citoplasma que no coincidían con la señal de Gc, pero que en estadios tempranos de replicación se encontraban alrededor de la factoría viral (Figura 10 B y C). Esta señal podría relacionarse con mitocondrias, ya que es uno de los orgánulos de la factoría de VBUN donde es posible encontrar NSs, y donde se ha visto que podría estar implicada en procesos relacionados con la apoptosis y con la alteración de la inmunidad celular (Colón-Ramos y cols., 2003; Barnwal B y cols., 2015).

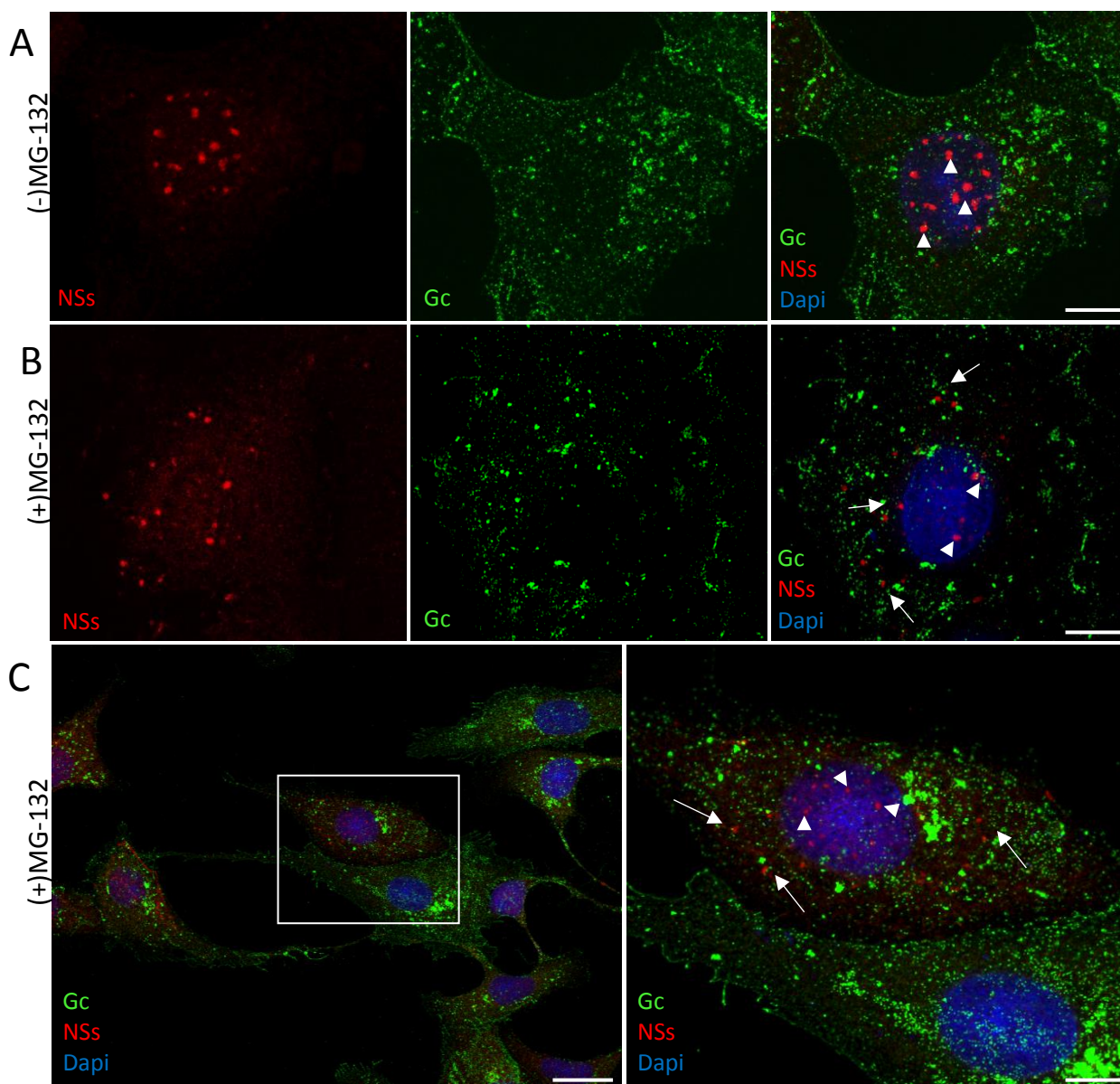


Figura 10 Marcaje de NSs mediante MF de células Vero tratadas con el inhibidor del proteosoma MG-132.

(A -C) Células Vero infectadas con VBUN a 1 UFP/célula a 10 h.p.i. Proyección de imágenes de microscopía confocal. Marcaje de la proteína viral NSs (rojo), del núcleo (Dapi, azul) y Gc, marcada con anti-Gc (verde). Las muestras fueron fijadas con metanol y tratadas con NP40. (A) Las células Vero sin tratar con MG-132 presentan un marcaje NSs nuclear (puntas de flecha). (B y C) Las células Vero tratadas con MG-132 presentan un marcaje de NSs nuclear (puntas de flecha) y citoplasmático (flechas). Barras: 8 μ m en A y B; 25 μ m en C y 8 μ m en el *zoom*.

Para poder estudiar de una forma más precisa la distribución de NSs en el núcleo y citoplasma, se realizó una reconstrucción 3D a partir de las imágenes de microscopía confocal (Figura 11 A) utilizando el software IMARIS. Mediante la representación de varios algoritmos de volumen y análisis cuantitativos, usando isosuperficies y segmentación, el programa genera un modelo tridimensional detallado (Figura 11 B-F). Este volumen muestra como NSs se distribuye por todo el núcleo en grandes cantidades, localizando en diferentes cavidades donde sólo se encuentra NSs (Figura 11 B-F). También es posible encontrarla en el citoplasma, donde no colocaliza con Gc (Figura 11 A-E, flechas en B). Cuando se estudió su localización en planos internos, se pudo observar una mayor concentración de la señal de NSs en zonas adyacentes a los acúmulos de Gc, posiblemente debido a que esa zona pertenece a la factoría viral y es donde mayor número de proteínas virales están siendo sintetizadas (Figura 11 F, flechas).

Por lo tanto, NSs se sintetiza en grandes cantidades en células Vero infectadas con VBUN, siendo la única proteína viral que además de encontrarse en las factorías, se acumula en el núcleo.

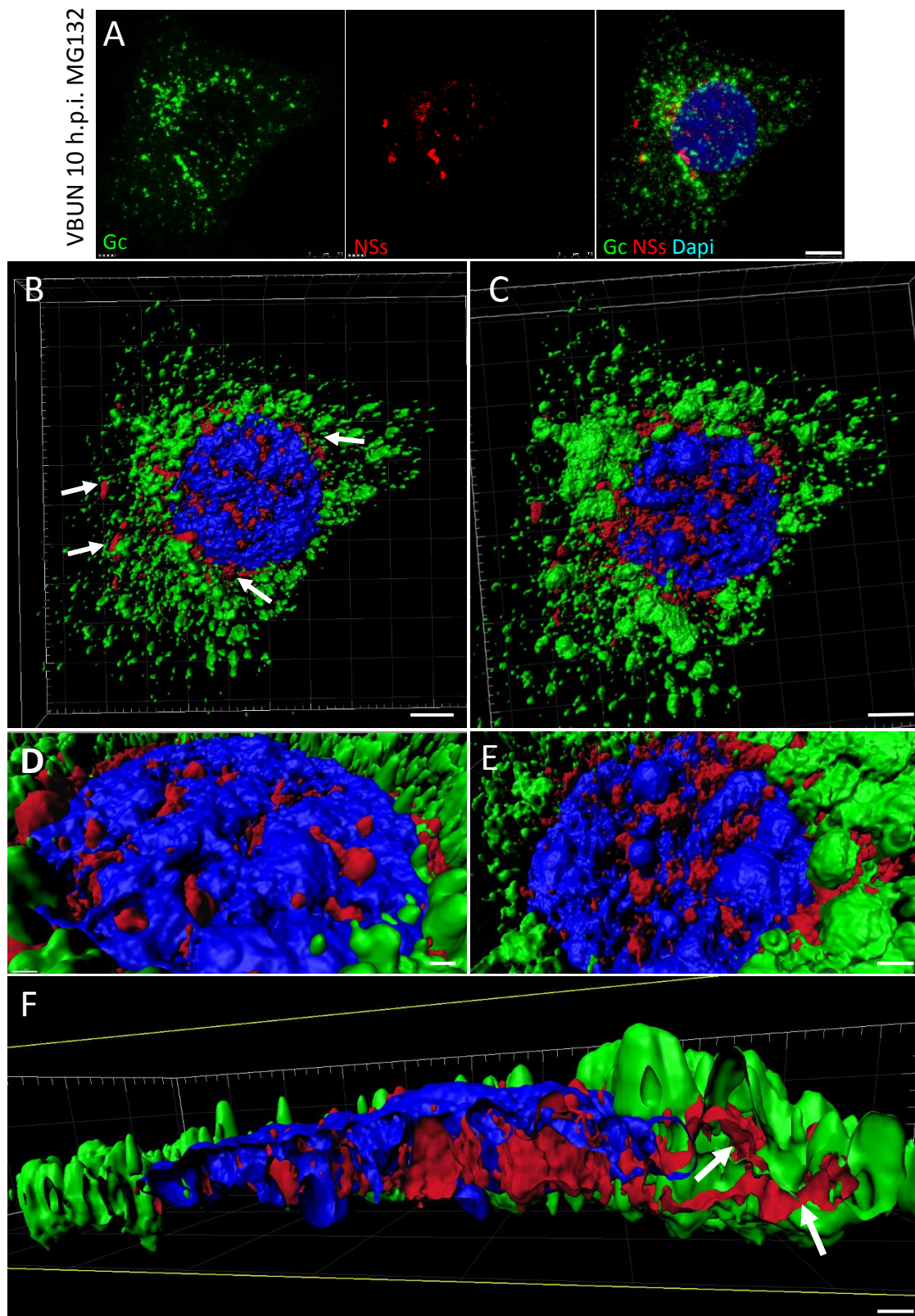


Figura 11. Microscopía confocal y reconstrucción 3 D de células Vero infectadas por VBUN, tratadas con MG-132 y procesadas mediante inmunofluorescencia con anti-NSs y anti-Gc.

(A) Células Vero infectadas con VBUN a 1 UFP/célula a 10 h.p.i. y tratadas con MG-132. Marcaje de la proteína viral NSs (rojo), del núcleo (Dapi, azul) y de Gc con anti-Gc (verde). Las muestras fueron

fijadas con metanol y tratadas con NP40. (B-F) Reconstrucción 3D de las proyecciones obtenidas mediante microscopía confocal con el programa Imaris. Se utilizaron secciones ópticas de 0,30 μm y con una separación de 0,20 μm entre cortes, obtenidas mediante microscopía confocal. (B) Zona apical de la célula. (C) Zona basal de la célula. (D) *Zoom* de la zona apical de la célula. (E) *Zoom* de la zona basal de la célula. (F) Sección perpendicular a la base de la célula mostrando el contenido del interior de la célula. Barras: 7,5 μm en A; 5 μm en B y C; 2 μm en D-F.

1.4.2.- NSs se localiza en mitocondrias. Estudios de MF e inmunomarcaje en criosecciones para ME.

El marcaje citoplasmático de NSs sugiere otras funciones llevadas a cabo por esta proteína no observadas anteriormente en la infección por VBUN. Como se observó en la reconstrucción 3D (Figura 11), NSs se encuentra en el citoplasma donde no colocaliza con Gc, pero donde se acumula cerca de las factorías virales. En otros virus de la familia, NSs es capaz de interactuar con las mitocondrias, como en el caso del virus CCHFV, donde NSs es capaz de desorganizar el potencial de membrana de las mitocondrias e inducir apoptosis (Barnwal B y cols., 2016). En nuestro caso, para comprobar si parte de la señal citoplasmática de NSs se asocia a mitocondrias, se realizaron estudios de MF. Para marcar las mitocondrias, se usó un anticuerpo frente a la proteína mitocondrial Tom22. TOM es un complejo proteico que se encuentra en la membrana mitocondrial externa, cuya función es permitir el movimiento de proteínas hacia el interior del espacio intermembranoso mitocondrial. Dado que Tom22 es una proteína de la membrana mitocondrial, los procesos de permeabilización con metanol, NP40 y saponina, necesarios para conseguir una mejor señal en NSs, no se pudieron aplicar, ya que esta fuerte permeabilización podría afectar a las mitocondrias y a la localización de Tom22.

Por lo tanto, las muestras fueron tratadas con MG-132 y permeabilizadas sólo con saponina. Se estudiaron un total de 500 células y en estas condiciones, sólo se obtuvo señal de NSs en el citoplasma de un escaso número de células (~5%). En las células que presentaban señal citoplasmática de NSs, se detectó una posible asociación con la señal de Tom22 (Figura 12 A). Para apoyar el estudio de MF, ya que el porcentaje de células marcadas era muy escaso, se realizó un estudio de inmunomarcaje en criosecciones para ME, lo que se conoce como la técnica de Tokuyasu (Tokuyasu y cols., 1973; Sachse y cols., 2018). Para este estudio las células Vero fueron infectadas con VBUN a 1 UFP/célula, tratadas con MG-132 a las 5 h.p.i. y fijadas a 10 h.p.i. Se procesaron también células Vero sin infectar como control. Las criosecciones se procesaron para inmunomarcaje con el anticuerpo anti-NSs y un anticuerpo secundario

conjugado con partículas de oro coloidal de 10 nm a dos concentraciones (1/50 y 1/100). En las concentraciones más altas (1/50) encontramos numerosas partículas de oro repartidas de forma inespecífica, por lo que a dicha concentración el estudio no resulta válido. Las muestras con la concentración más baja (1/100) no presentaban fondo inespecífico significativo. El marcaje (1/100) en las células no infectadas usadas como control, muestra pocas partículas de oro dispersas por la célula y repartidas de forma aleatoria, sin unión preferente a ningún elemento celular (Figura 12 B y C); de 122 mitocondrias estudiadas se encontró que tan sólo un 8,9% de las mitocondrias presentaban una o dos partículas de oro. En las células infectadas con VBUN se obtuvo un marcaje específico en mitocondrias, de 290 mitocondrias estudiadas se encontró que un 56,5% de las mitocondrias presentaban grupos de 2 a 4 partículas de oro. De forma similar ocurre en el núcleo y nucléolo, donde se encontró que el 68% de los núcleos de las células infectadas presentaban partículas de oro frente al 12% de núcleos con partículas de oro en las células no infectadas (Figura 12 D-G). Los marcajes en criosecciones indican que NSs interacciona con la periferia de las mitocondrias. Esta localización, podría indicar que NSs podría estar participando en procesos que alteren la inmunidad innata (Scott I, 2010; Anand SK y Tikoo S, 2013).

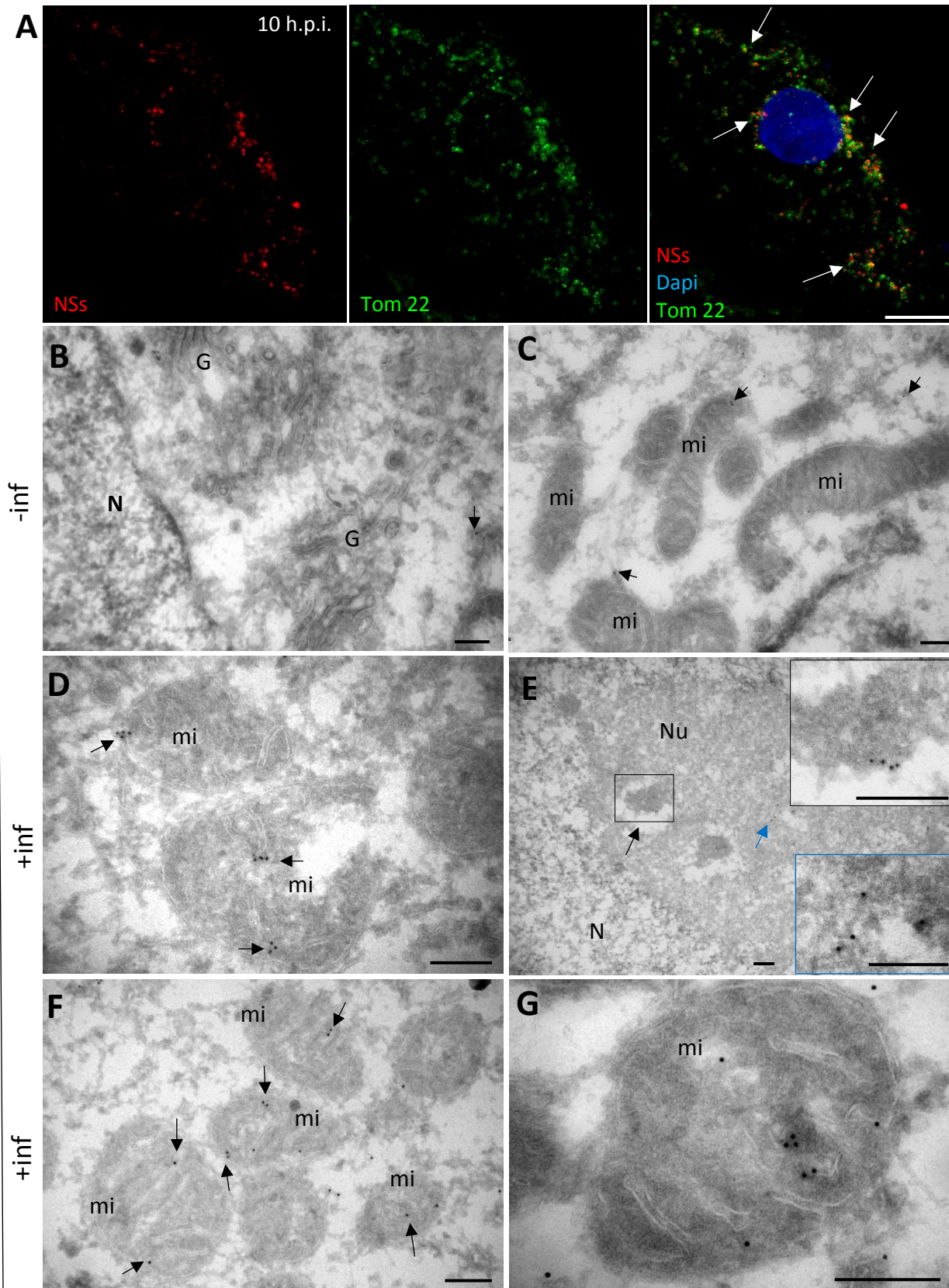


Figura 12 Marcaje de NSs y Tom22 mediante inmunofluorescencia e inmunomarcaje de NSs en criosecciones para ME.

(A) Células Vero infectadas con VBUN a 1 UFP/célula a 10 h.p.i. y tratadas con MG-132. Marcaje de la proteína viral NSs (en rojo), del núcleo (Dapi, azul) y de las mitocondrias con anti-Tom22 (en

verde). Las flechas señalan zonas con señal de NSs y Tom22. (B -G) Imágenes de ME de criosecciones de células Vero marcadas con anti-NSs y un anticuerpo secundario conjugado con oro coloidal de 10 nm. (B y C) Control negativo, células Vero sin infectar, las flechas señalan partículas de oro coloidal. (D-G) Células Vero infectadas con VBUN a 1 UFP/célula a 10 h.p.i. y tratadas con MG-132. (D, F y G) Señal en mitocondrias (flechas). (E) Señal en nucléolo (flecha azul y recuadro azul inferior) y en una zona densa del nucléolo (flecha negra y recuadro superior). Barras: 10 μ m en A; 200 nm en B-G.

1.5.- Estudio de la factoría viral en células Vero infectadas con el virus recombinante rBUN-DeINSs.

A diferencia de VBUN, el ciclo vital de rBUN-DeINSs es más lento como muestran las curvas de crecimiento (Figura 13 A). Al replicar con menos eficacia, el rBUN-DeINSs es también menos patogénico (Bridgen A y cols., 2001). Cuando se estudian los porcentajes de células infectadas en el tiempo se obtienen también valores por debajo de los de VBUN. A 16 h.p.i. sólo tenemos un 30% de células infectadas frente al 100% que encontramos en VBUN (Figura 13 B). Como se puede observar en las curvas de crecimiento, a 16 h.p.i. tenemos ya unos títulos virales de 6×10^4 (UFP/ml) (Figura 13 A) que nos indican que ya se ha producido al menos un ciclo de replicación del virus, lo que nos permite usar este tiempo de post-infección para caracterizar la factoría temprana que ensambla el rBUN-DeINSs.

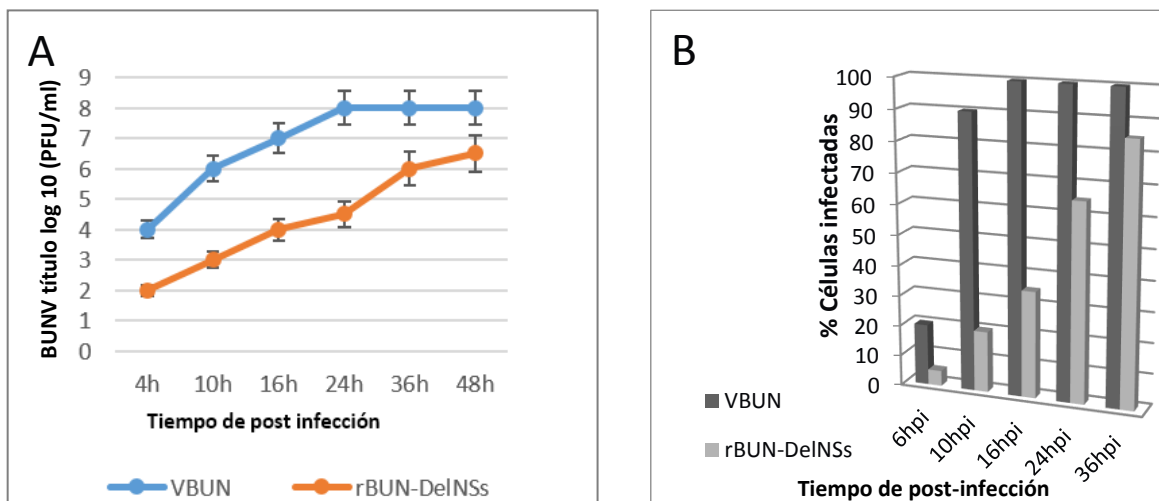


Figura 13 Curvas de crecimiento de VBUN y rBUN-DeINSs y porcentaje de células infectadas en cultivos de células Vero.

(A) Curvas de crecimiento de VBUN y rBUN-DeINSs en células Vero a diferentes tiempos de post-infección (4h, 10h, 15h, 24h, 36h, 48h). Los datos mostrados son representativos de al menos tres experimentos independientes. (B) Gráfico del porcentaje de células Vero infectadas por VBUN y rBUN-DeINSs a 1 UFP/célula, a diferentes tiempos de post-infección (6h, 10h, 16h, 24h, 36h).

Para estudiar las células Vero infectadas con rBUN-DelNSs se realizaron estudios de MF y ME. Las células Vero fueron infectadas con rBUN-DelNSs a 1 UFP/célula a 16 h.p.i. Los estudios a este tiempo de post-infección mostraron que estructuralmente la mayoría de los componentes celulares tienen un aspecto normal (Figura 14). Para los estudios de MF se usaron anticuerpos para estudiar la factoría viral (anti-Gc y anti-N), el Golgi (anti-Gigantina) y anticuerpos frente a la proteína Tom22 (anti-Tom22) para el marcaje de mitocondrias. Como se puede observar en la Figura 14 A (flechas) y 14 C, tenemos factorías virales pequeñas donde las mitocondrias no son reclutadas masivamente. La señal de Gc es discreta y se encuentra menos esparcida por el citoplasma que en células Vero infectadas con VBUN (Figuras 1 y 9), colocalizando parcialmente con un Golgi fragmentado, pero no disperso (Figura 14 B, flecha blanca). El núcleo muestra una cromatina homogénea y un nucléolo presente (Figura 14 B, flecha verde). Los estudios de ME muestran células con un citoplasma denso y los orgánulos sin alteraciones significativas. La factoría por lo tanto no parece producir un reclutamiento masivo de orgánulos en los estadios iniciales de la infección como ocurre en VBUN. Las mitocondrias apenas son agrupadas en torno a la factoría viral en los estadios iniciales, como sucede con el virus wt. Se observa un reclutamiento de mitocondrias a un tiempo más tardío (Figura 14 C y D), pero no tan marcado como en VBUN (Figuras 1 y 2). También se observa un Golgi fragmentado, pero no disperso (Figura 14 D). Se estudiaron la mayoría de las secciones de 30 células infectadas por rBUN-DelNSs obteniéndose un 70% menos de ORs que en las células infectadas por VBUN; estos ORs se encontraban sin anomalías evidentes (Figura 14 D, recuadro). De igual manera se encontraba un 60% menos de virus intracelulares y un 52% menos de virus extracelulares, los cuales no presentaban anomalías evidentes (Figura 14 D y E). No se han observado en este caso acúmulos intracelulares de partículas virales como en el caso de VBUN o rBUNGc-eGFP y los virus se encuentran predominante en vesículas con una o dos partículas en su interior (Figura 14 E). Las mitocondrias presentaban un estado cercano a la normalidad, sin variación en el tamaño o la forma, con un aspecto poco denso y sin alteraciones visibles en las crestas mitocondriales (Figura 14 F), a diferencia de las mitocondrias encontradas en las células infectadas por VBUN, que poseen un aspecto denso y crestas hinchadas (Figura 14 G). En cuanto al núcleo, encontramos un nucléolo con aspecto normal, sin acúmulos densos y sin fragmentar (Figura 14 C y H).

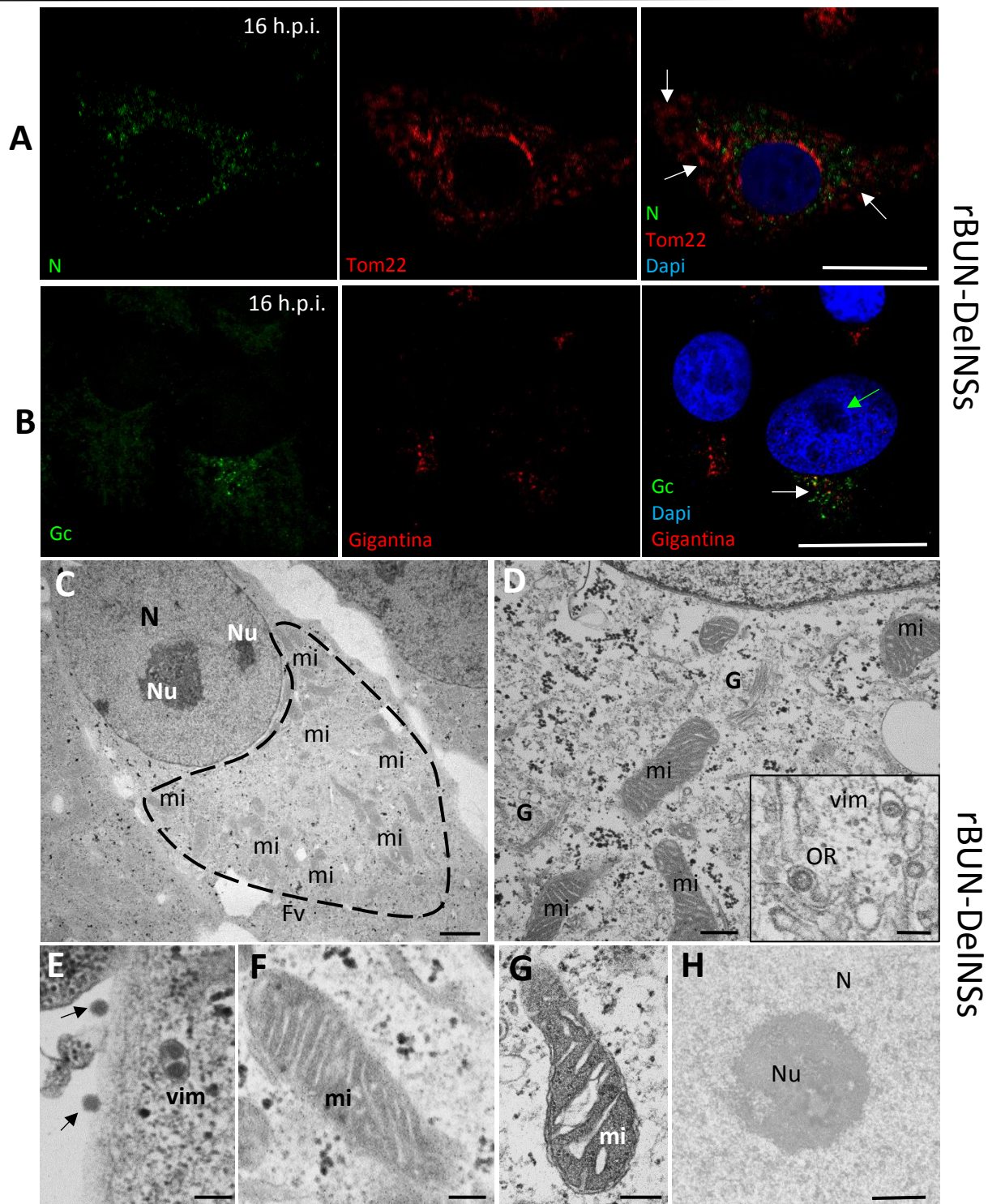


Figura 14 MF y ME de células Vero infectadas con rBUN-DelNSs a 16 h.p.i.

Células Vero infectadas con rBUN-DelNSs a 1 UFP/célula a 16 h.p.i. (A y B) Proyección de imágenes de microscopía confocal. (A) Marcaje de la proteína viral N (verde), del núcleo (Dapi, azul) y mitocondrias (anti-Tom22, rojo). Las flechas apuntan a mitocondrias. (B) Marcaje de la proteína viral Gc (verde), del núcleo (Dapi, azul) y Golgi (anti-Gigantina, rojo) la flecha blanca apunta a elementos del Golgi fragmentado sin dispersar, la flecha verde a un núcleo sin alterar con nucléolo. (C-F y H) ME de secciones ultrafinas orientadas de células Vero infectadas por rBUN-DelNSs a 1 UFP/célula 16 h.p.i. (C) Imagen de baja magnificación donde se observa el estado del núcleo (N), nucléolos (Nu) y la factoría viral con mitocondrias (mi). (D) Imagen de mayor magnificación de la factoría viral, Golgi (G) fragmentado y orgánulo de replicación (OR) (recuadro). (E) Virus intracelulares maduros (vim) y extracelulares (flechas). (F) Mitocondria de una célula infectada con rBUN-DelNSs. (G) Mitocondria de una célula infectada con VBUN. (H) ME del nucléolo de una célula infectada a mayor magnificación. Barras: 25 μ m en A y B; 2 μ m en C, recuadro 200 nm; 200 nm en E-G; 1 μ m en H.

1.5.1.- Estructura del núcleo y la factoría viral en células Vero infectadas con rBUN-DelNSs a tiempos largos de post-infección.

Para completar la caracterización del virus rBUN-DelNSs, se realizaron estudios de MF y ME en células Vero a un tiempo largo de post-infección (36 h.p.i.). Al tener delecionada la proteína NSs, rBUN-DelNSs pierde su principal factor de virulencia, y tiene un crecimiento más lento. Los estudios a 16 h.p.i. podrían estar mostrando estadios iniciales de la infección y por lo tanto, una menor alteración del núcleo junto con una factoría viral más pequeña. Mediante MF a 36 h.p.i. (Figura 15), se observa mayor señal de proteínas virales N y Gc que a 16 h.p.i. (Figura 14). Esta señal se encuentra predominantemente agrupada en la factoría viral, pero también por toda la célula con un patrón punteado que corresponde muy probablemente a vesículas de secreción con virus (Figura 15 A y B). A este tiempo las mitocondrias aún mantienen una distribución dispersa (Figura 15 A). El Golgi mantiene una distribución similar a la de tiempos de post-infección menores, fragmentado, pero sin dispersarse (Figura 15 B).

Los estudios de ME de secciones seriadas de 20 células muestran un núcleo con nucléolos de aspecto compacto y normal (Figura 15 C y D). En cuanto al citoplasma se muestra algo menos denso y con orgánulos algo más alterados que a 15 h.p.i., pero sin alteraciones importantes (Figura 15 D). Las mitocondrias también son reclutadas en la factoría viral pero no de forma tan marcada como en el virus *wt* (Figura 15 C y D). A 36 h.p.i. tenemos un 20% más de ORs (Figura 15 E), un 40% más de partículas virales intracelulares y un 60% más de virus extracelulares que a 16 h.p.i. (Figura 15 E-G). La salida de las partículas virales ocurre de forma similar a lo observado en el virus *wt*, por la zona basal de las células y asociada a fibras (Figura 15 G). Estos resultados muestran como, incluso a tiempos largos de post-infección con rBUN-DelNSs la célula mantiene una estructura conservada, con un escaso reclutamiento de orgánulos en zonas concretas de la célula y un núcleo sin alteraciones.

Los resultados obtenidos en el estudio comparativo entre VBUN y el mutante rBUN-DelNSs sugieren que NSs es la proteína viral responsable de los cambios drásticos en el núcleo y nucléolo. La ausencia de NSs resulta en una menor replicación viral y en un menor efecto citopático, por lo que NSs podría estar alterando mecanismos de inmunidad celular. También NSs podría estar participando en la biogénesis de la factoría viral. Todos estos resultados nos han servido para caracterizar de forma detallada como se configura la factoría viral de VBUN en las células Vero, como paso previo a los estudios de los efectos de los diferentes fármacos estudiados y que se describen a continuación.

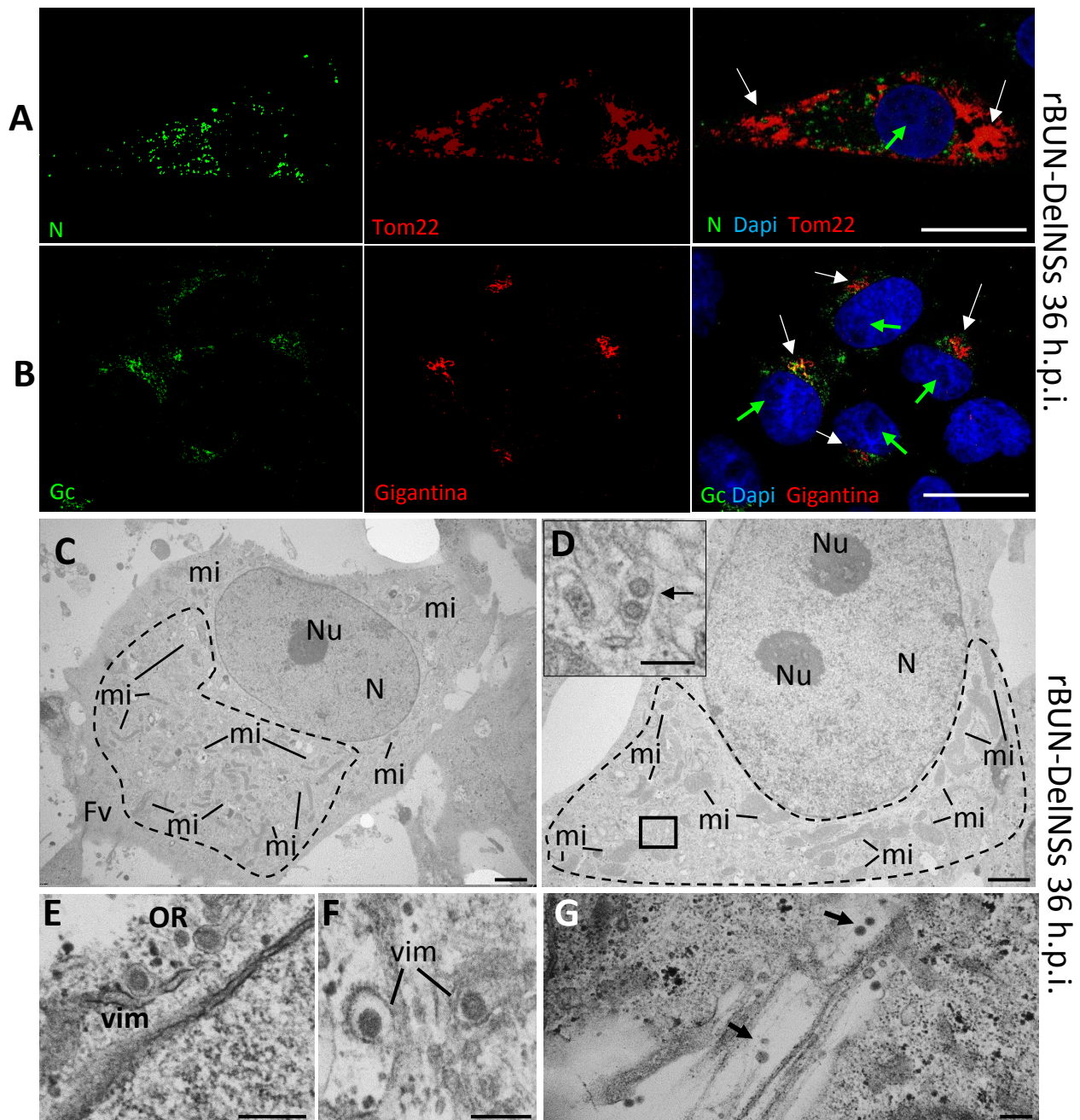


Figura 15 MF y ME de células Vero infectadas con rBUN-DelNSs a 36 h.p.i.

Células Vero infectadas por rBUN-DelNSs a 1 UFP/célula a 36 h.p.i. (A y B) Proyección de imágenes de microscopía confocal. (A) Marcaje de la proteína viral N (verde), del núcleo (Dapi, azul) y mitocondrias (anti-Tom22, rojo). Las flechas blancas apuntan a mitocondrias, la flecha verde a un nucléolo. (B) Marcaje de la proteína viral Gc (anti-Gc, verde), del núcleo (Dapi, azul) y Golgi (anti-Gigantina, rojo). Las flechas blancas muestran el aparato de Golgi sin disgregar que localiza con Gc en células infectadas, las flechas verdes marcan a nucléolos. (C y D) ME de secciones ultrafinas orientadas de células Vero infectadas por rBUN-DelNSs a 1 UFP/célula 36 h.p.i. (C) Imagen a menor magnificación donde se observa el estado del núcleo y del citoplasma y la factoría viral (Fv). (D) Imagen de la factoría viral (Fv) con la presencia de vim (recuadro y zoom) y con la presencia de nucléolos (Nu) sin alteraciones. (E) Orgánulo de replicación (OR). (F) Virus intracelulares maduros o vim. (G) Virus extracelulares asociados a fibras (flechas). Barras: 25 μ m en A y B; 2 μ m en C y D, recuadro en 200 nm; 200 nm en E-G.

2.- Ribavirina.

Como ya se ha descrito en la introducción, la RBV es un análogo de nucleósido de amplio espectro que ha mostrado actividad antiviral frente a una gran variedad de virus ARN y ADN en cultivos celulares. En este trabajo se realizaron diferentes estudios para valorar la efectividad de RBV y su toxicidad en células Vero infectadas con VBUN. Para ello se llevaron a cabo infecciones a diferentes concentraciones y diferentes tiempos de post-infección. Esto nos ha permitido saber cuáles son las condiciones óptimas para una buena neutralización del virus, sin que las concentraciones usadas resulten tóxicas a nivel celular. Con estas condiciones hemos estudiado posibles mecanismos de acción nuevos para RBV, así como el posible origen de resistencias a RBV generadas en cultivos celulares.

2.1.- Efectos de la Ribavirina en células Vero infectadas por VBUN.

Está descrito que RBV resulta más tóxica en ciertas líneas celulares, como ocurre en los glóbulos rojos y en los hepatocitos (Page T y Connor JD, 1990; Ilyin GP y cols., 1998; Russmann y cols., 2006). Sin embargo, son muchos los trabajos que demuestran que a concentraciones efectivas de RBV la viabilidad de las células Vero no resulta alterada (Shimajima M y cols., 2014; Kihira S y cols., 2014). Se ha descrito que con una concentración de RBV > 62.5 µg/mL la viabilidad de las células Vero decrece (Lee MJ y cols., 2016). Basándonos en la bibliografía se decidió usar un rango de concentraciones (10, 20, 32 y 50 µg/mL) que en un principio no debieran resultar tóxicas en nuestra línea celular. Confirmamos que incubando nuestras células Vero con concentraciones de RBV de 20 a 50 µg/mL durante 72h, no se producían cambios morfológicos ni muerte celular. Tampoco se alteró su crecimiento, pudiéndose hacer pases celulares viables después de la incubación. Con todas las concentraciones indicadas anteriormente, se observó un efecto inhibitor del VBUN incluso con las concentraciones más bajas. Con 20 µg/mL a 10 h.p.i. en un total de 500 células estudiadas se conseguía una inhibición del 20% en el número de células infectadas de acuerdo con las señales de MF, usando como marcador de la infección la proteína Gc. A concentraciones de 32 µg/mL a 10 h.p.i se obtuvo una fuerte inhibición del crecimiento del virus, se eliminaba la señal de Gc en torno al 70% de 500 células estudiadas. Finalmente se observó que la concentración óptima de RBV es 50 µg/mL, ya que no producía un efecto tóxico en las células y se obtuvo en 500 células estudiadas a 10 h.p.i. una inhibición de la infección del ~90%. También se probó añadir la droga a diferentes tiempos de post-infección. Cuando RBV se añadía a 6 h.p.i. el efecto inhibitor era mucho menor, a las 10 h.p.i. de 500 células estudiadas se obtuvo un 60% de

células infectadas, sin embargo cuando RBV se añadía inicialmente a 1 h.p.i. se conseguían los mejores resultados, tan sólo un 10% de células mostraban signos de infección a las 10 h.p.i. En otro experimento las células Vero fueron pre-incubadas con RBV, después se retiró el medio y se realizó la infección. Esto no resultó en una mayor inhibición del crecimiento del virus, se obtuvo un 85% de células infectadas sobre un total de 500 células estudiadas. Finalmente se probó a pre-incubar el stock de virus con RBV y las partículas virales no resultaron afectadas, ya que eran tan infectivas como las no expuestas a la droga, por lo que podemos confirmar que RBV no inactiva las moléculas de la polimerasa viral dentro de las partículas virales.

Una vez establecida la concentración idónea de RBV para el tratamiento de células Vero infectadas con VBUN en 50 µg/mL, así como que resultaba más eficaz si las células disponían de la droga desde el inicio de la infección (1 h.p.i.), se estudió la evolución de la infección en los cultivos celulares en contacto con la droga. Como muestra la Figura 16 A, RBV es capaz de disminuir en un 90% el número de células infectadas a 10 h.p.i. A tiempos más tardíos el bloqueo desaparece. Con RBV 50 µg/mL a 10 h.p.i. disminuye la cantidad de proteína viral Gc frente a concentraciones menores como se muestra por *western blot* (Figura 16 B). Como muestran las curvas de crecimiento, los títulos virales decrecen de forma considerable, del orden de dos unidades logarítmicas frente a las células no tratadas (Figura 16 C).

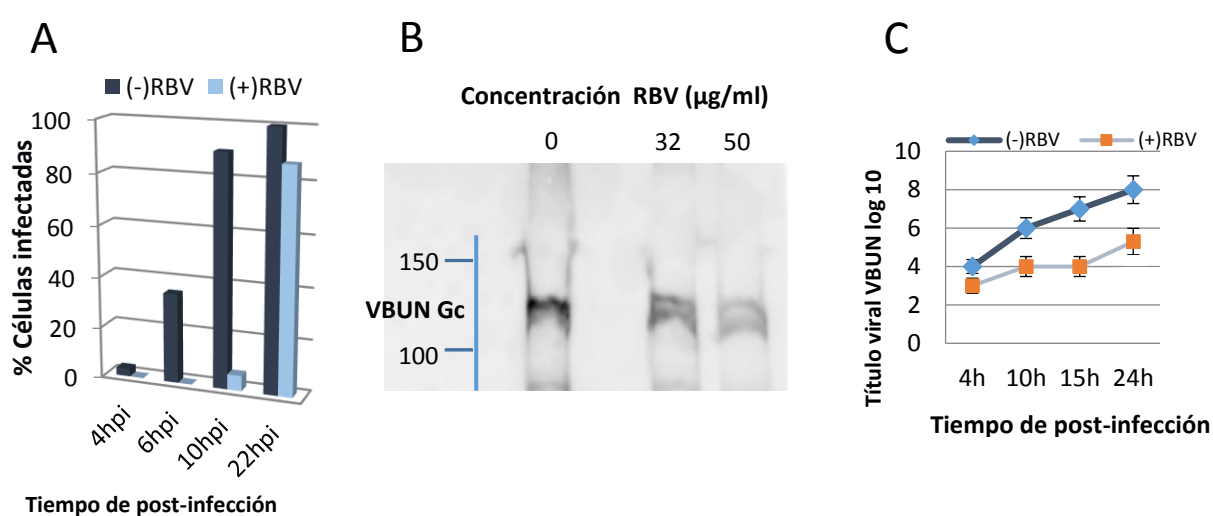
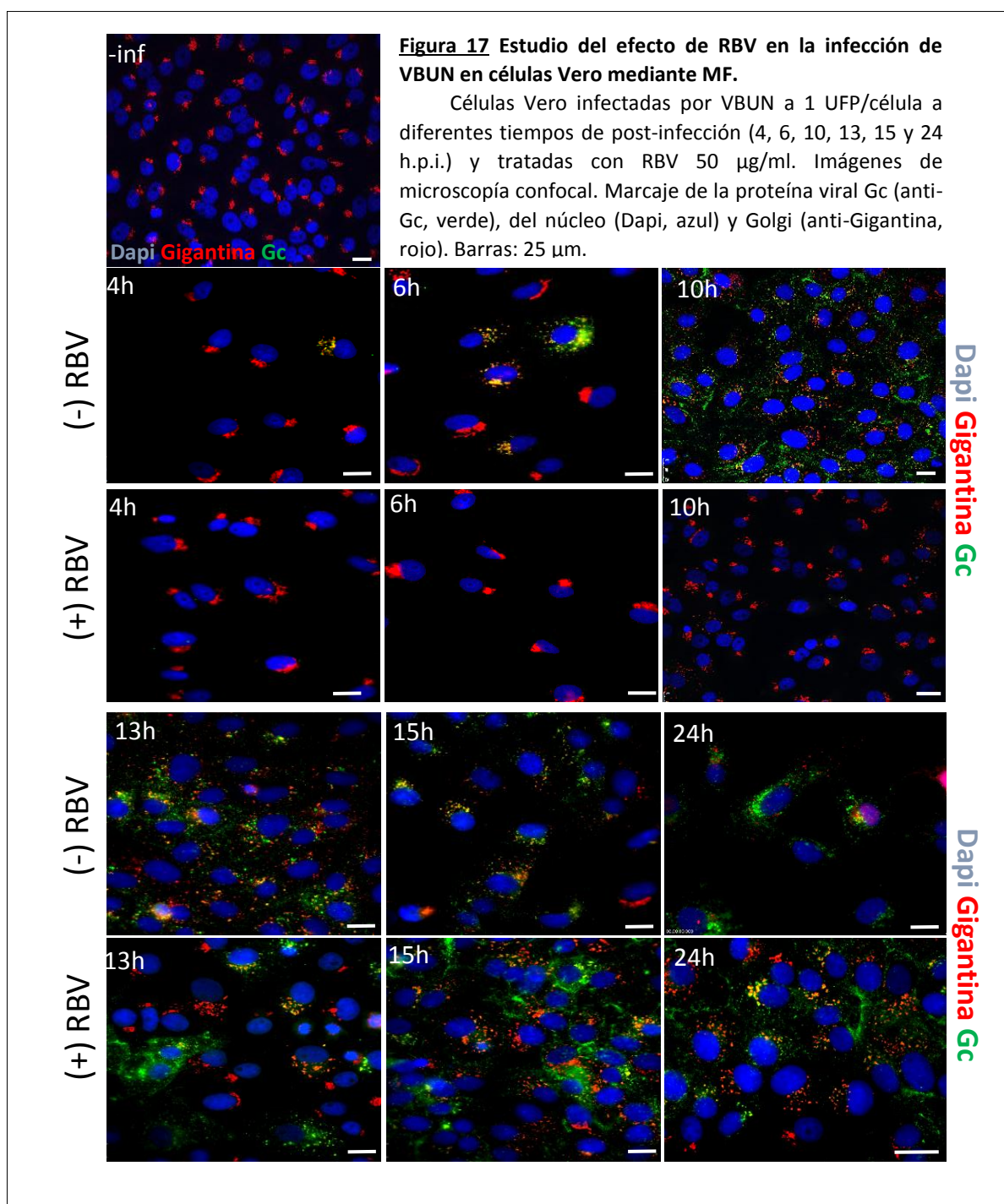


Figura 16 Porcentaje de células infectadas, *western blot* de la proteína Gc y curva de crecimiento en células Vero infectadas con VBUN en presencia y ausencia de RBV.

(A) Gráfico comparativo del porcentaje de células Vero infectadas por VBUN a 1 UFP/célula a diferentes tiempos de post-infección (4h, 6h, 10h, 22h) tratadas con RBV (azul claro) y sin tratar (azul oscuro) n=500. (B) Detección de Gc mediante *western blot* en células tratadas con RBV 32 µg/ml y 50 µg/ml frente a células no tratadas. (C) Curva de crecimiento de VBUN en células Vero tratadas con RBV (azul claro) y sin tratar (azul oscuro) a diferentes tiempos post-infección (4h, 10h, 15h, 24h). Los datos mostrados son representativos de al menos tres experimentos independientes.

Para estudiar la evolución de la infección en células infectadas y tratadas con RBV a tiempos largos, las células Vero fueron infectadas con VBUN a 1 UFP/célula a diferentes tiempos de post-infección (4, 6, 10, 13, 15 y 24 h.p.i.) y visualizadas mediante microscopía confocal (Figura 17). La MF muestra que en presencia de la droga no se observa infección a 10 h.p.i. pero a partir de 13 h.p.i. se observan células infectadas. A 24 h.p.i. casi toda la monocapa se encuentra completamente infectada en presencia de RBV (Figura 17).



Estos datos indican, que a tiempos largos de post-infección (>13 h.p.i.), hay un incremento de la señal de células infectadas en presencia de RBV, lo cual puede deberse a que la célula destruye la droga, o a que se generan virus resistentes a la RBV, ya que cuando vuelve a añadir RBV 50 µg/ml a las 10 h.p.i. no disminuye la señal de Gc ni el % de células infectadas a 24 h.p.i. Estudios de ME de células con y sin RBV a tiempos cortos de post-infección fueron complicados porque como muestran los resultados de la MF y la curva de crecimiento tenemos un porcentaje muy pequeño de células infectadas (<4%). A 4 h.p.i. la mayoría de células infectadas y no tratadas estudiadas mediante MF y ME no mostraban aún signos de infección (Figura 18 A-C), no encontrándose apenas ORs, virus intracelulares ni extracelulares. En este tiempo en las células no tratadas con RBV ya se ha producido el primer ciclo de replicación y las escasas células que presentan signos de infección, poseen aún cambios muy discretos, como es la aparición de nucléolos con zonas densas (Figura 18 C, flechas) y algunos ORs en el citoplasma, pero por lo general la célula aún mantiene un citoplasma y núcleo prácticamente sin alteraciones. La factoría viral aún no se ve con claridad. Cuando las células son tratadas con RBV (Figura 18 D-F) no se distingue ninguna estructura viral ni cambios en la organización celular; el núcleo se encuentra sin alteraciones (Figura 18 F).

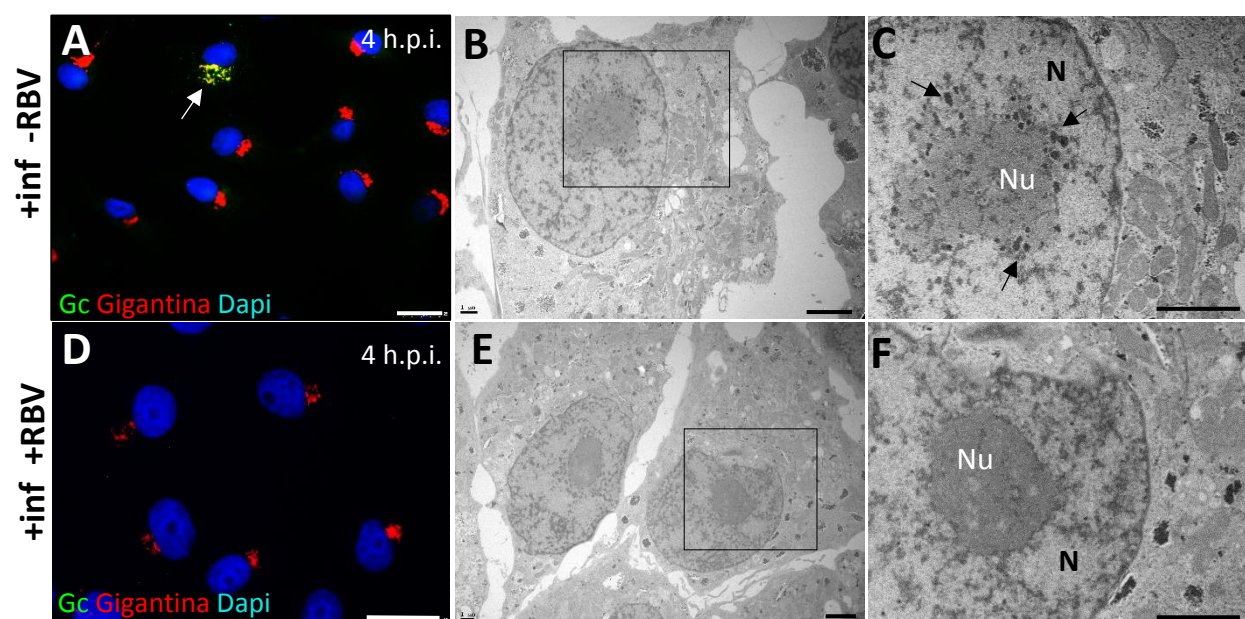


Figura 18 ME y MF de Células Vero infectadas con VBUN a 4 h.p.i. en ausencia y presencia de RBV.

Células Vero infectadas con VBUN 1 UFP/célula, 4 h.p.i. (A y D) Proyección de imágenes de microscopía confocal. Marcate de la proteína viral Gc (anti-Gc, verde), del núcleo (Dapi, azul) y Golgi (anti-Gigantina, rojo). (A) Sin RBV, se observan pocas células con señal de Gc (flecha). (B y C) ME de células sin RBV. (B) Imagen a menor magnificación, el nucléolo está ligeramente alterado. (C) Zoom del nucléolo marcado con rectángulo en B; se observa la presencia de zonas densas (flechas). (D) Células tratadas con RBV 50 µg/ml, no se observa señal de Gc. (E y F) ME de células con RBV. (E) Células a baja magnificación, no se observan cambios en los nucléolos. (F) Zoom del nucléolo marcado con rectángulo en E; no se observa ninguna alteración. Barras: 25 µm en A y D; 2 µm en (B,C,E,F).

A continuación, se estudiaron células Vero infectadas con VBUN a 10 h.p.i. y tratadas con RBV. RBV produjo una buena inhibición pero algunas células estaban infectadas. Las monocapas infectadas a 1 UFP/célula y tratadas con RBV 50 µg/ml, mostraron a las 10 h.p.i. sobre un total de 500 células estudiadas un 90% de células no infectadas y un 7% de células infectadas con un patrón típico en MF en (Figura 19 A, recuadro y *zoom*) similar al de las células infectadas no tratadas y un 3% de células infectadas con patrones atípicos. Estas células tenían una señal de Gc discreta junto con una señal de Golgi sin dispersar y con nucléolo aún visible (Figura 19 B, recuadro y flecha en *zoom*). Algunas de estas células, presentaban un Golgi disperso, pero sin señal de Gc que podría corresponder también a células en división (Figura 19 C, recuadro y *zoom*).

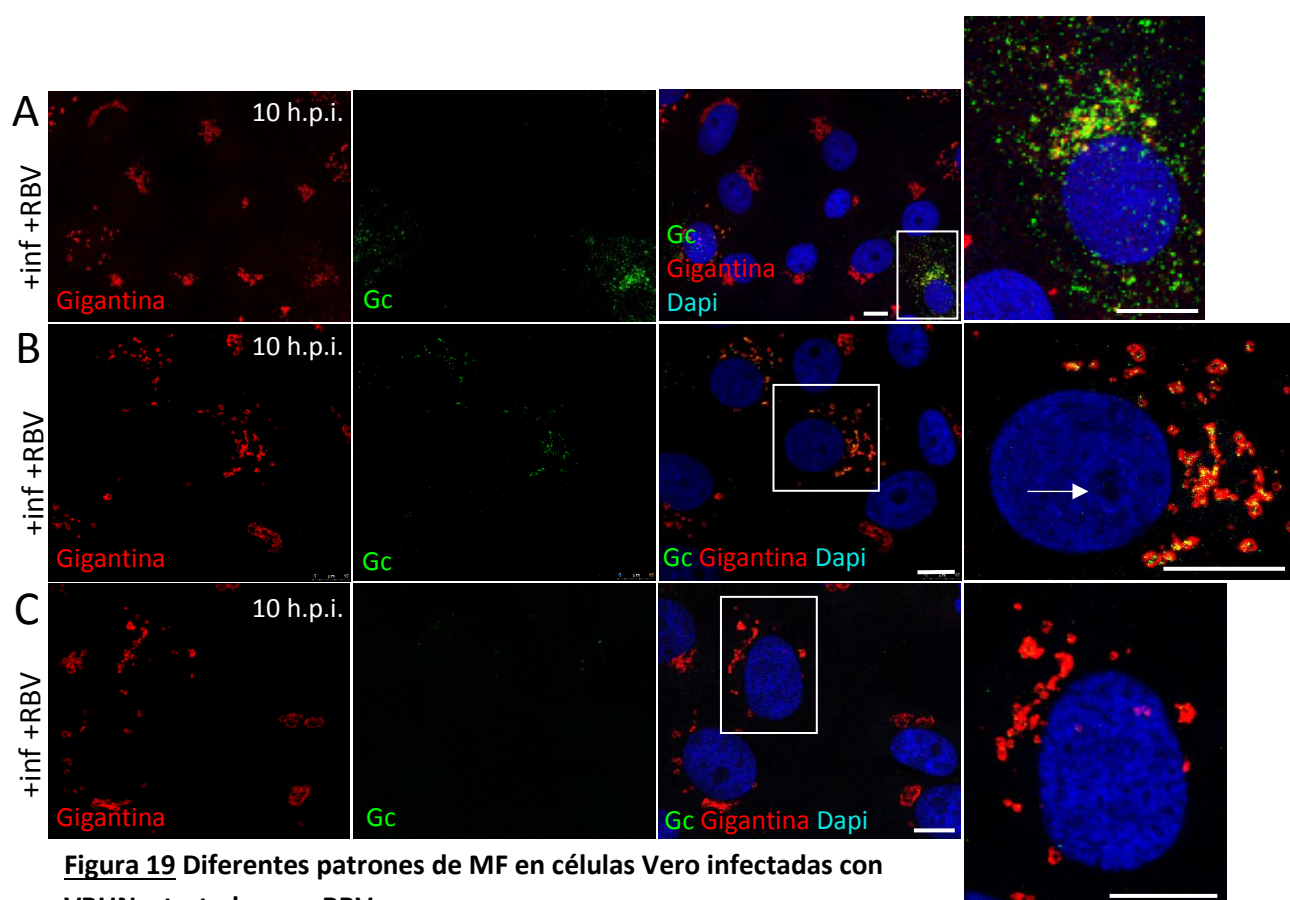


Figura 19 Diferentes patrones de MF en células Vero infectadas con VBUN y tratadas con RBV.

Células Vero infectadas por VBUN a 1 UFP/célula a 10 h.p.i. y tratadas con RBV 50 µg/ml. Proyección de imágenes de microscopía confocal. Marcaje de la proteína viral Gc (anti-Gc, verde), del núcleo (Dapi, azul) y Golgi (anti-Gigantina, rojo). (A) Fenotipo 1, característico de la infección con VBUN. Núcleo alterado sin nucléolo, Golgi disperso y señal de Gc por toda la célula (recuadro y *zoom*). (B) Fenotipo 2, con escasa señal de Gc, núcleo sin alterar con nucléolo visible (flecha en *zoom*), Golgi ligeramente fragmentado (recuadro y *zoom*). (C) Fenotipo 3, Golgi ligeramente fragmentado sin señal de Gc y nucléolo no visible (recuadro). Las imágenes de la derecha son *zooms* de las células marcadas por los recuadros. Barras: 10 µm.

2.2.- Estudio de los efectos de RBV mediante CLEM y ME.

Células Vero infectadas con el virus fluorescente rBUNGc-eGFP a 1 UFP/célula y 16 h.p.i., y tratadas con RBV 50 µg/ml, se procesaron mediante CLEM (Figura 20). Se hicieron 3 experimentos de CLEM donde se estudiaron un total de 15 células. Se seleccionaron aquellas células que presentaban señal de GFP (Gc) y un núcleo alterado sin nucléolo visible (Figura 20 A y B) para compararlas con las células infectadas y no tratadas. Las células fueron incluidas en resina epoxi para su posterior estudio mediante ME (Figura 20 C y D). En los cortes ultrafinos realizados en estas células seleccionadas por MF, se encontraron factorías virales (Figura 20 D) pero más pequeñas que en células infectadas y no tratadas. Cuando se estudiaron en detalle las esférulas que albergan los CRs, se observó que eran escasas y estaban alteradas: las esférulas poseían un contenido poco denso (Figura 20 D, recuadro) y la periferia de la estructura se encontraba alterada (Figura 20 D, *zoom 1*) en comparación con las esférulas sin alteraciones en las células no tratadas con RBV (Figura 20 D, recuadro rojo, *zoom 2*).

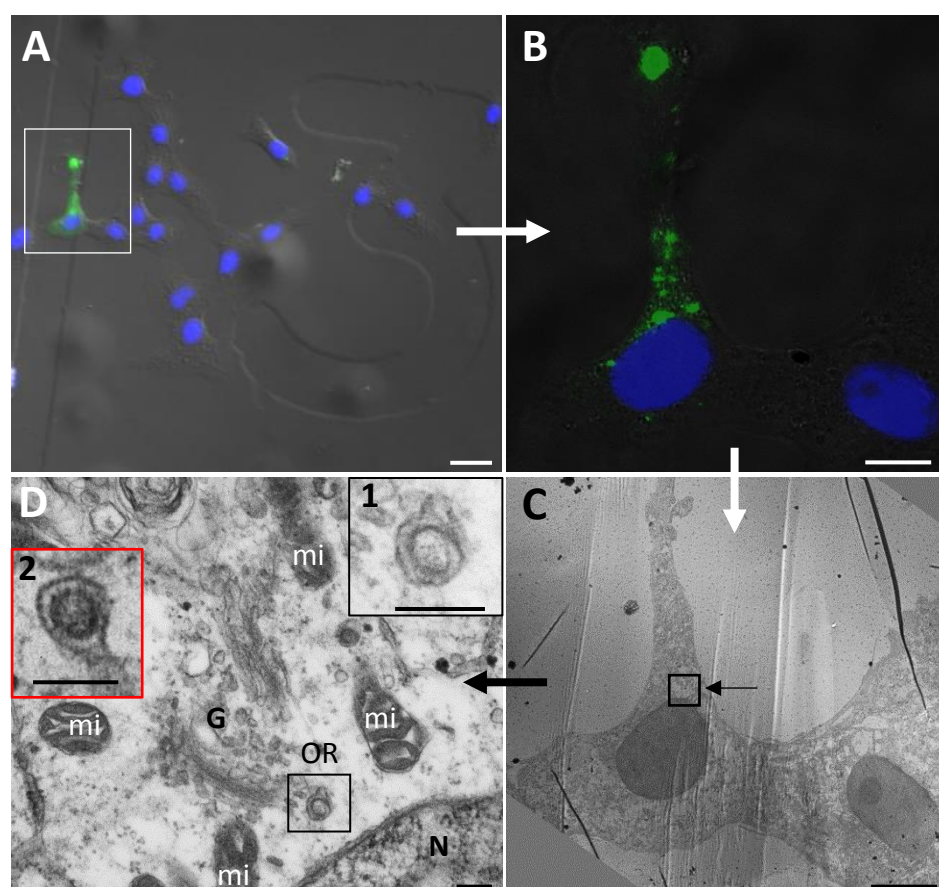


Figura 20. CLEM de células Vero infectadas por rBUNGc-eGFP y tratadas con RBV.

Las células Vero crecidas en un soporte con cuadrícula, fueron infectadas con rBUNGc-eGFP a 1 UFP/célula a 16 h.p.i. y tratadas con RBV 50 µg/ml. (A y B) Mediante microscopía de fluorescencia se seleccionan las células a estudiar (recuadro blanco). En verde se observa la señal de GFP de

rBUNGc-eGFP y el núcleo (Dapi, azul). (C y D) En las imágenes de ME se observa una factoría viral con una esférula que posee un contenido poco denso (recuadro). *Zoom 1* (recuadro negro): esférula de la célula tratada con RBV a mayor magnificación; *Zoom 2* (recuadro rojo): esférula normal en una célula infectada y no tratada con RBV. Barras: 10 μm en A-C; 100 nm en D.

Los resultados de CLEM mostraron que las células en las que el virus había conseguido multiplicarse en presencia de RBV, diferían de las células infectadas y no tratadas con RBV. Con RBV, encontramos una mejor conservación del citoplasma celular que en las células infectadas y no tratadas, así como la presencia de ORs con el dominio globular alterado. Para valorar si este evento era significativo, se realizó un estudio de un mayor número de células infectadas con VBUN mediante secciones orientadas y ME, ya que con CLEM el número de células que se puede estudiar es limitado. Este estudio, también pretendía esclarecer, en qué situación se encuentra la mayoría de células infectadas y tratadas con RBV, ya que en un 90% de las mismas no se observaba señal de crecimiento del virus mediante MF.

Para ello se estudiaron más de 300 células, haciendo cortes seriados orientados de las monocapas celulares. Se hizo un amplio estudio comparativo entre las células infectadas y no tratadas con RBV (Figura 21 A-F) y células infectadas con VBUN y tratadas con RBV 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 21 G-K). Se observó que a diferencia de los cambios que se producen en células infectadas y no tratadas con RBV (Figura 21 A-F), la mayoría de células infectadas y tratadas con RBV (~90%), no presentaba cambios morfológicos, ni se detectaba en ellas ninguna estructura viral (Figura 21 G). En apariencia, este 90% de células mantiene un aspecto similar en la ultraestructura a las células sin infectar, lo que muestra una alta eficacia de la RBV.

Tan sólo se encontró en torno a un 10% de células infectadas y tratadas que mostraban signos de infección. En este 10%, se observó que la mayoría de las células presentaban alteraciones similares entre ellas. A diferencia de lo que se observa en las células infectadas no tratadas con RBV, donde encontramos un nucléolo muy disgregado y con presencia de grandes acúmulos densos (Figura 21 B), el nucléolo de este 10% de células tratadas con RBV y con signos de infección muestra unas alteraciones ligeramente más discretas, no se encuentra tan disgregado y los acúmulos densos son más pequeños (Figura 21 H, recuadro e I, recuadro). En un 25% de las células infectadas y no tratadas con RBV encontramos estructuras membranosas grandes con partículas virales (Figura 21 C) mientras que en las células tratadas con RBV no se observan. Cuando comparamos los ORs formados en células infectadas y sin tratar con RBV (Figura 21 D-F) con las estructuras formadas en las células infectadas y tratadas con RBV, observamos que en estas células el 77% de los ORs se encuentran alterados (Figura 21 J y K).

Dentro de este 10% de células con signos de infección, se encontró un 2,3% de células tratadas con RBV que presentaban un escaso número de ORs sin alteraciones aparentes, y virus intracelulares de apariencia normal.

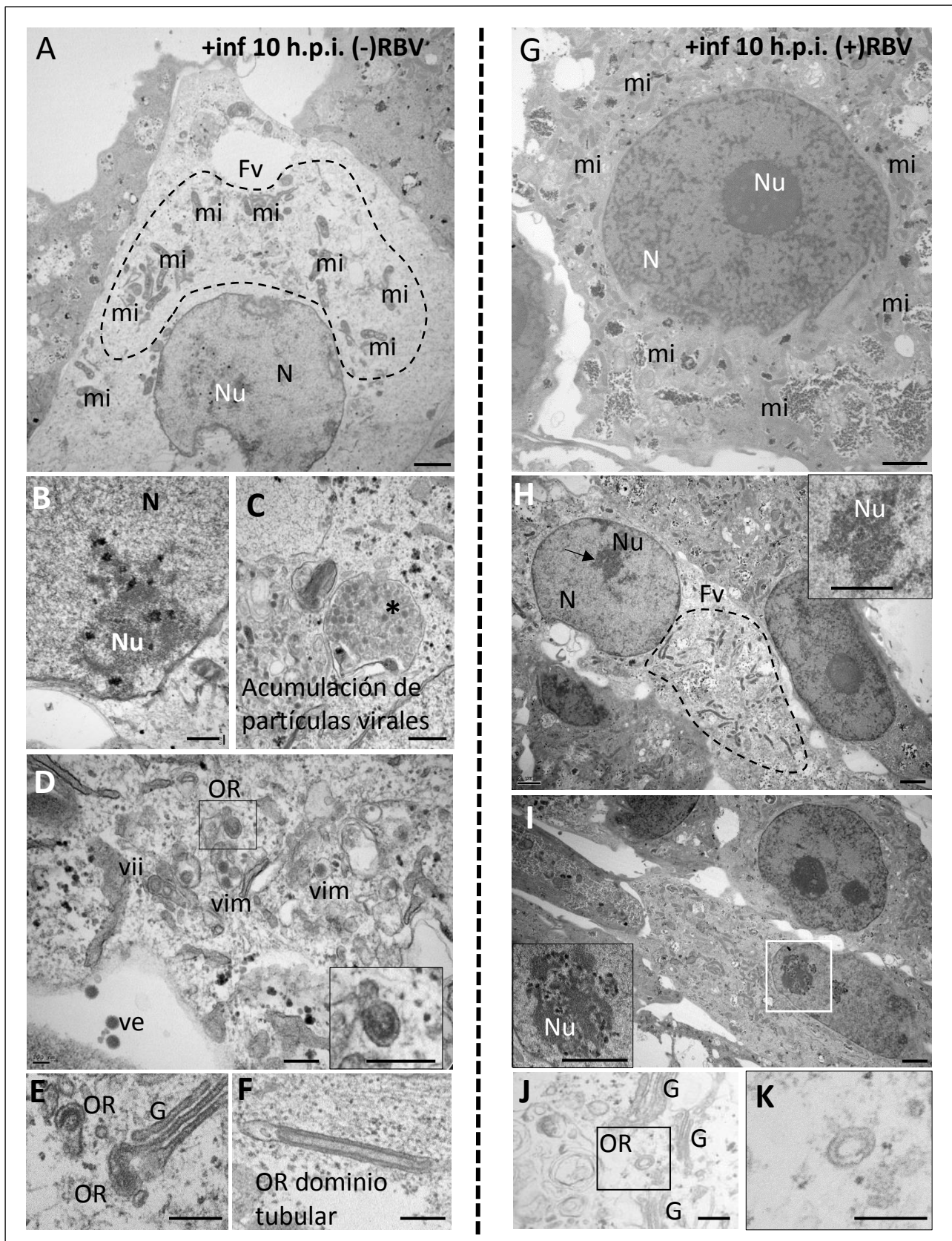


Figura 21. ME de células infectadas con VBUN en ausencia y presencia de RBV.

ME de secciones ultrafinas orientadas de células Vero infectadas con VBUN a 1 UFP/célula y a 10 h.p.i. Columna de la izquierda células sin tratar, columna de la derecha células tratadas con 50 µg/ml de RBV. (A) Célula con un patrón estándar de infección, se muestran la factoría viral (Fv) y nucléolo alterado (Nu). (B) Imagen a mayor magnificación de un nucléolo alterado. (C) Estructura membranosa con partículas virales (asterisco). (D) OR, virus intracelulares inmaduros (vii), maduros (vim) y virus extracelulares (ve); la imagen a alta magnificación del recuadro muestra el dominio globular de un OR. (E) Dominios globulares de los ORs a mayor magnificación. (F) Dominio tubular de un OR. (G) Célula a baja magnificación tratada con RBV. No se aprecia ningún cambio estructural. (H) Células tratadas con RBV donde se observa una célula con cambios estructurales discretos, una factoría viral (Fv) y un nucléolo (Nu) ligeramente alterado. Nucléolo a mayor magnificación (recuadro). (I) Célula con un nucléolo ligeramente alterado con pequeños gránulos densos. Nucléolo a mayor magnificación (recuadro). (J) OR con un dominio globular alterado, vacío o poco denso en célula tratada. (K) Imagen a mayor magnificación del OR. Mitocondria (mi); Golgi (G). Barras: 2 µm en (A,G,H,I); 400 nm en B y C; 200 nm en (D, E, F, J y K).

2.3.- Cuantificación de estructuras virales en células infectadas por VBUN frente a células infectadas y tratadas con RBV.

Para cuantificar los cambios producidos por la RBV en células infectadas, se estudiaron gran parte de las secciones de 315 células, cuantificando todos los elementos virales descritos en la infección de VBUN, así como los cambios morfológicos que la infección induce en la célula. Los resultados se resumen en la Tabla 1.

Estructuras virales y morfología celular	Células Vero infectadas a 1 UFP/célula con VBUN 10 h.p.i. Sin RBV	Células Vero infectadas a 1 UFP/célula con VBUN 10 h.p.i. Tratadas con RBV 50 µg/ml
Nº células	60	315
Infec/no infec	58/2 (96%)	42/273 (13.3%)
Virus intracelulares	170	14
Virus extracelulares	600	11
Orgánulos de replicación (ORs) totales	52	18
ORs alterados	2	14
Golgi fragmentado	59	38
Dominios tubulares de ORs	5	0
Estructuras membranosas con virus	15	0
Nuécleo alterado	55 (92%)	36 (11%)
Núcleo alterado	55 (92%)	36 (11%)
Citoplasma alterado	56 (93%)	38 (12%)

Tabla 1 Cuantificación de estructuras virales y cambios morfológicos celulares en células Vero infectadas con VBUN y tratadas con y sin RBV.

Dicho estudio cuantitativo mostró una gran eficacia de RBV a 10 h.p.i., obteniéndose una disminución en la cantidad de estructuras virales en torno al ~90%, datos que como ya se ha mostrado, se correlacionan con los obtenidos en *western blot*, MF y curvas de crecimiento. También se verificó que aquellas células que mostraban signos de infección, no presentaban las mismas alteraciones que las observadas en células no tratadas con RBV. Esto indica que, pese a que el virus ha sido capaz de proliferar en este pequeño porcentaje de células tratadas con RBV, no es capaz de realizar su ciclo vital de una forma eficaz.

2.4.- RBV altera la morfología del dominio globular de los ORs.

En esta investigación, se ha demostrado que en el caso de VBUN, la RBV no actúa en la entrada viral o directamente contra la partícula viral. Los resultados sugieren que RBV estaría inhibiendo la transcripción y replicación de VBUN mediante diferentes interacciones con la RpRd del virus. Como ya se ha descrito, en un 10% de células, encontramos que a 10 h.p.i. obtenemos señal de proteínas virales mediante MF. En estas células no se ha conseguido bloquear por completo la infección viral. Los estudios de CLEM y ME indicaron que el escaso número de células tratadas con RBV que presentaban signos de infección, mostraban ciertas particularidades con respecto a las células infectadas y no tratadas. Posiblemente el resultado más relevante es la alteración estructural de los dominios globulares o esférulas de los ORs. Estas esférulas presentan un aspecto ligeramente hinchado, están deformadas y tienen un interior poco denso, lo que apunta a que podrían estar vacías (Figura 22). Esto sugiere que en las esférulas alteradas no se está sintetizando el ARN viral debido a la acción de RBV sobre la RpRd. La morfología alterada de las esférulas también sugiere que la RBV podría estar interfiriendo con un posible papel estructural de la RpRd en la arquitectura de las esférulas (Figura 22).

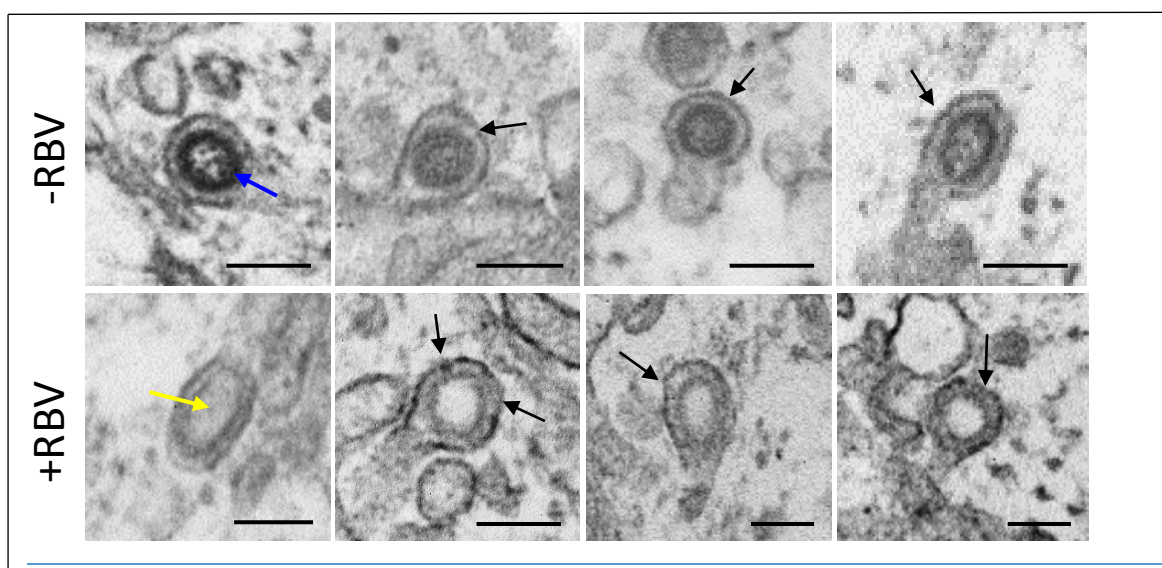


Figura 22. ME de los cambios inducidos por RBV en los ORs.

ME de secciones ultrafinas orientadas de células Vero infectadas con VBUN a 1 UFP/célula, 10 h.p.i. Fila superior, los dominios globulares de los ORs formados en células sin tratar con RBV tienen un aspecto compacto y un interior denso (flecha azul). La membrana periférica está bien delineada (flechas). Fila inferior, los dominios globulares de los ORs en células tratadas con RBV 50 µg/ml, están alterados, su estructura es menos compacta y su interior es poco denso, aparentemente vacío (flecha amarilla). La membrana periférica tiene imperfecciones (flechas). Barras. 100 nm.

2.5.- La multiplicación de VBUN en presencia de RBV da lugar a variantes del virus con infectividad y patogenicidad reducidas.

Uno de los efectos antivirales atribuidos a RBV es el de actuar como un mutágeno del ARN viral (Crotty S y cols., 2001; Cameron CE y Castro C, 2001; Mejer N y cols., 2018). En la literatura se sugiere que la incorporación de RBV como un análogo de nucleótido induce errores en la replicación, resultando en una disminución de la producción viral (Lanford y cols., 2001).

En este trabajo se seleccionaron virus resistentes a la RBV para su posterior estudio (Figura 23). Las células Vero fueron infectadas a 1 UFP/célula con VBUN en presencia de RBV 50 µg/ml durante 10 h.p.i. (Figura 23 A). En estos cultivos se recogieron virus intra- y extracelulares. La infectividad de estos virus se calculó con el protocolo estándar de titulación mediante ensayo de placas de lisis, pero con una modificación: transcurridos los 3 días de incubación de las muestras, estas no son fijadas. Las placas de lisis y la periferia de éstas, que corresponden a virus que han conseguido multiplicarse y lisar las células, y por lo tanto son virus que han escapado a la RBV, son recogidas con una punta de pipeta (Figura 23 B) y conservadas en medio DMEM a 4°C overnight para que el virus difunda (Figura 23 C). Este medio se emplea posteriormente como inóculo para propagar el virus (Figura 23 D). Tras propagar el virus durante 5 días, se recogieron los virus extracelulares y los intracelulares, se titularon y se usaron para infectar las células Vero (Figura 23 E). El comportamiento de estos virus fue estudiado mediante titulación viral, *western blot*, MF y ME (Figura 23 F).

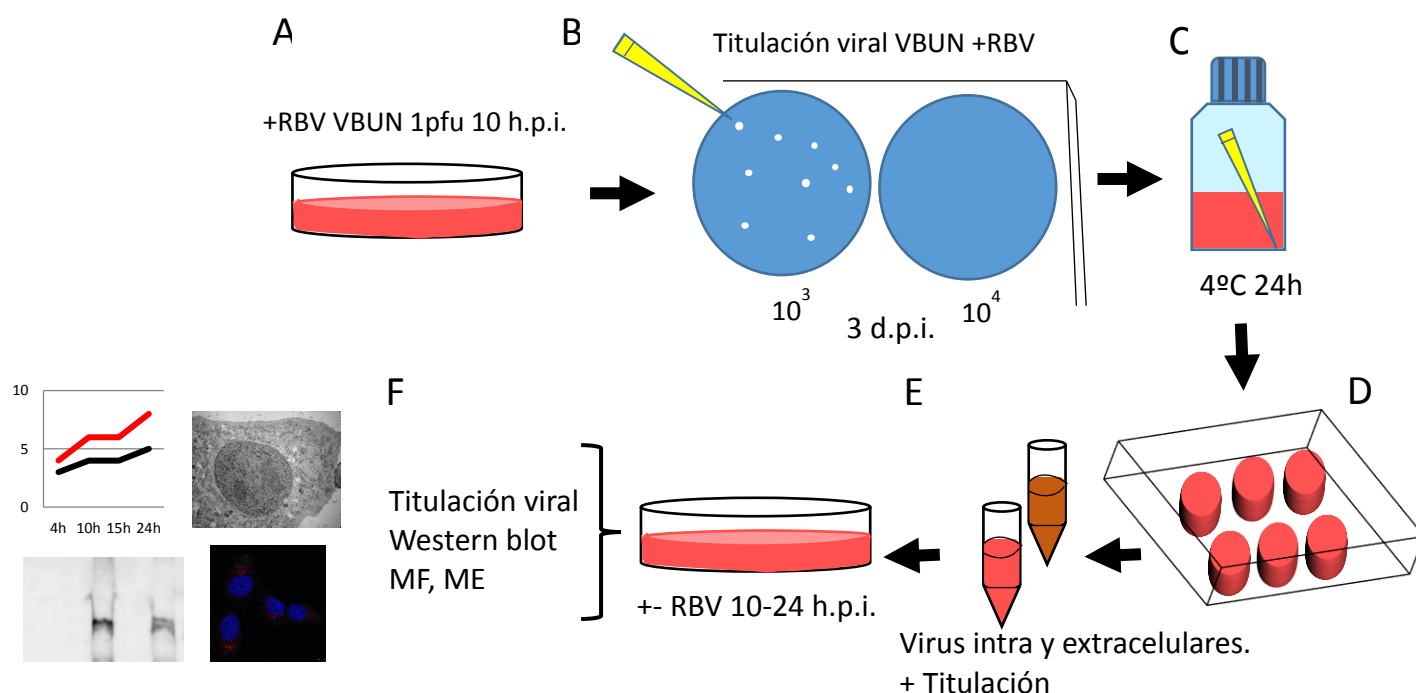


Figura 23. Esquema del protocolo para la selección de virus resistentes a RBV.

Para seleccionar los virus resistentes a RBV, siempre se recogió la periferia de las placas de lisis. Cuando se infectaban células con estos virus a 1 UFP/célula a 10 h.p.i., de 500 células estudiadas se obtuvo en torno a un 5% de células infectadas (Figura 24 A y B), las cuales poseían un patrón diferente a las células infectadas con virus que no han estado en contacto con RBV. Las pocas células infectadas tienen una señal de Gc muy discreta con un Golgi compacto y un núcleo que no parece alterado y que aún posee el nucléolo (Figura 24 A y B). No se obtuvieron diferencias significativas cuando se infectaba con los inóculos procedentes de la propagación de los virus extracelulares en comparación con los intracelulares. Se decidió forzar la situación para ver qué ocurría si se infectaba con una mayor cantidad de virus. Se infectaron células a ~ 10 UFP/célula a 10 h.p.i. y se obtuvo señal de Gc en un 90% de las células. Como muestra la Figura 24 C y D esta señal volvía a tener un fenotipo particular, la señal de Gc se encontraba dispersa por toda la célula y en muchas de las células no colocalizaba con el Golgi que aún se mantenía agrupado. Algunos núcleos, aunque mostraban signos de alteración, aún mantenían el nucléolo presente (Figura 24 C y D).

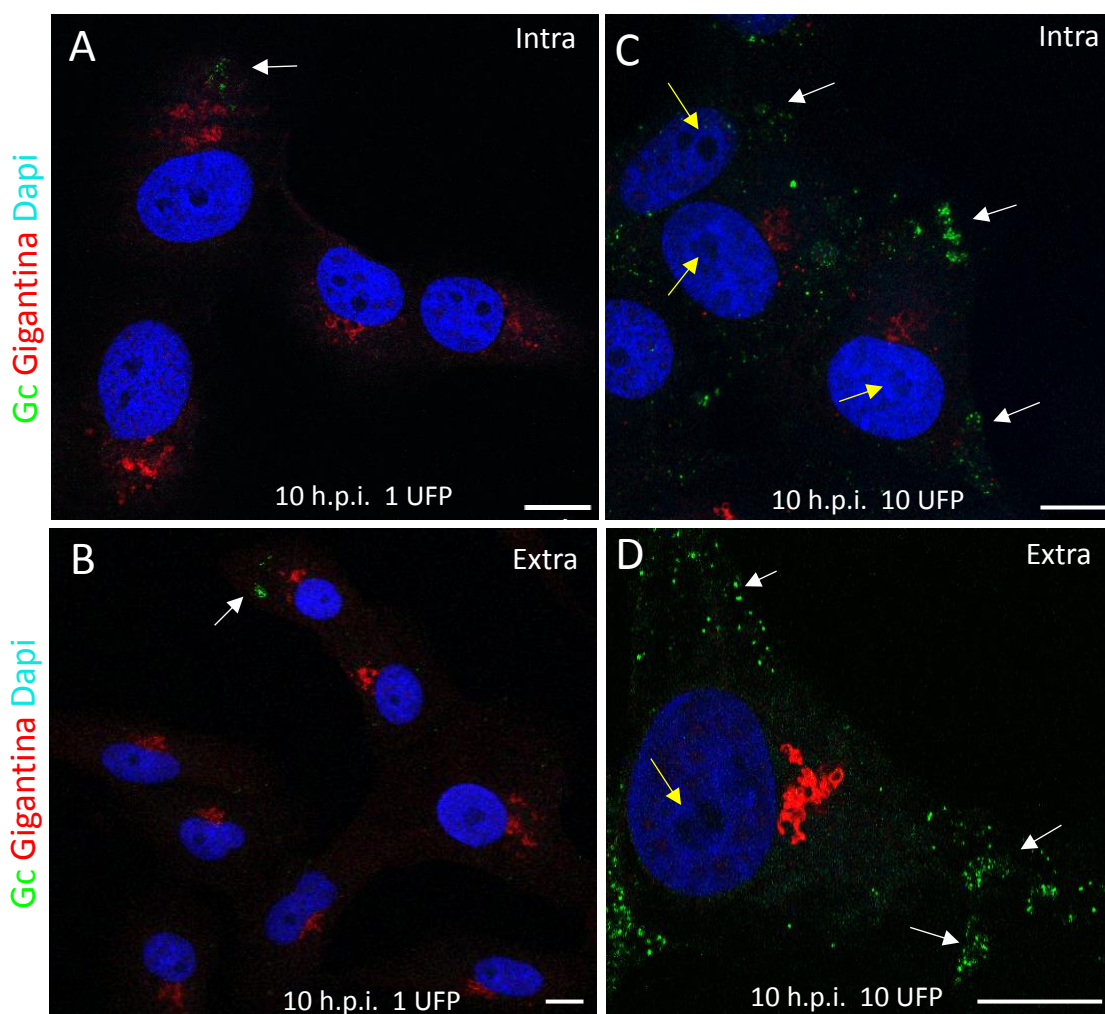


Figura 24 MF de células Vero infectadas con los virus que se han multiplicado en presencia de RBV.

Células Vero infectadas con virus obtenidos según el protocolo para la obtención de variantes de VBUN resistentes a RBV. Proyección de imágenes de microscopía confocal. Marcaje de la proteína viral Gc (anti-Gc, verde), del núcleo (Dapi, azul) y Golgi (anti-Gigantina, rojo). (A y B) Células infectadas a 1 UFP/célula a 10 h.p.i. con virus intra y extracelular que se ha multiplicado en presencia de RBV. (A-B) Señal débil de Gc que no colocaliza con Golgi (flechas blancas). (C y D) Células infectadas a 10 UFP/célula a 10 h.p.i. Gc se distribuye de forma dispersa (flechas blancas) y no colocaliza con Golgi, que presenta un aspecto normal; núcleos normales y nucléolos visibles (flechas amarillas). Barras: 10 μ m.

Cuando se infectaban células con los virus que se habían propagado en presencia de RBV a 1 UFP/célula a 10 h.p.i. y se añadía de nuevo RBV 50 μ g/mL, se encontró que la inhibición de la infección era prácticamente total cuando las muestras eran estudiadas por MF, obteniendo <2% con señal de Gc (Figura 25 A y B flechas). A tiempos más largos de post-infección se obtuvo una señal discreta de Gc que no colocaliza con el aparato de Golgi en células aparentemente normales (Figura 25 C). Al forzar las condiciones infectando a 10 UFP/célula a 10 h.p.i. y RBV 50 μ g/mL se encontró una situación similar a la descrita anteriormente, se

obtuvo señal de Gc en un 80% de las células, pero sólo un 3% de estas células presentaban los signos típicos de la infección como es el Golgi fragmentado o núcleo alterado (Figura 25 D, recuadro amarillo). En estas células la señal de Gc no coincidía con el aparato de Golgi, el cual se encuentra agrupado y el nucléolo es visible (Figura 25 D y E, flechas). Este resultado indica que los virus que sobreviven al tratamiento con RBV son capaces de replicarse sin usar la región *cis* del aparato de Golgi para ensamblar su factoría.

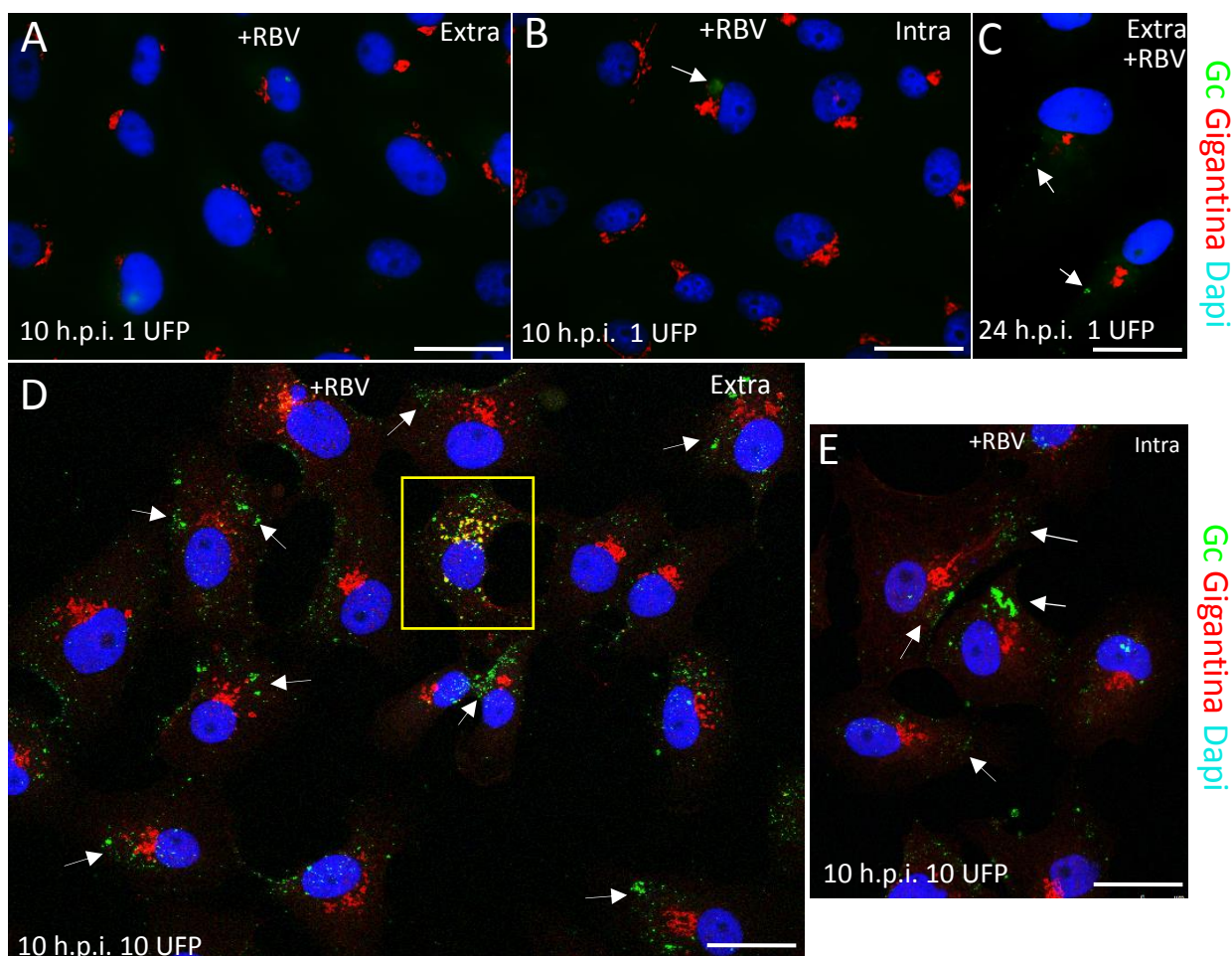


Figura 25 MF de células Vero infectadas con virus que se han multiplicado en presencia de RBV y se las vuelve a incubar con RBV.

Células Vero infectadas con virus obtenidos con el protocolo para la obtención de colonias resistentes a RBV y que han sido tratadas de nuevo con RBV 50 µg/ml. Proyección de imágenes de microscopía confocal. Marcaje de la proteína viral Gc (anti-Gc, verde), del núcleo (Dapi, azul) y Golgi (anti-Gigantina, rojo). (A y B) Células infectadas a 1 UFP/célula con virus intra- y extracelulares que se han multiplicado en presencia de RBV. (B) se observa señal de Gc que no colocaliza con Golgi (flecha). (C) Infección con virus extracelulares a 24 h.p.i. con señal débil de Gc (flechas). (D y E) Células infectadas a 10 UFP/célula, provenientes de virus extra- e intracelulares. Patrón atípico con señal de Gc agrupada o dispersa (flechas blancas), que no colocaliza con un Golgi de aspecto normal; núcleos con cromatina homogénea y nucléolos visibles. (D) Recuadro amarillo: Fenotipo de una infección normal, Golgi disgregado, señal de Gc y nucléolo no visible. (E) Patrón atípico con señal de Gc agrupada o dispersa (flechas blancas), que no colocaliza con un Golgi de aspecto normal. Barras: 25 µm.

La cuantificación de los resultados se recoge en la Tabla 2. Mediante MF se estudiaron un total de más de 500 células y se cuantificó el porcentaje de células con señal para Gc detectada en cada condición, así como los cambios producidos en el núcleo y en el aparato de Golgi. Se comparó el virus *wt* con las diferentes condiciones procedentes de los virus que habían logrado multiplicarse en presencia de RBV (virus mutados). Se puede apreciar que los virus que habían sobrevivido al tratamiento con RBV resultaban ser menos infectivos, incluso en condiciones forzadas (10 UFP/célula). Además mostraron una señal intracelular atípica en comparación con el virus *wt*.

Células infectadas	(-)inf	1 UFP 10 h.p.i. Virus Wt -RBV	1 UFP 10 h.p.i. Virus Wt +RBV	1 UFP 10 h.p.i. Virus mutados	10 UFP 10 h.p.i. Virus mutados	1 UFP 10 h.p.i. Virus mutados +RBV	10 UFP 10 h.p.i. Virus mutados +RBV
Fenotipo típico -Señal Gc normal -Golgi disperso -Núcleo alterado	0%	95%	10%	<3%	4%	<2%	3%
Fenotipo atípico -Señal de Gc dispersa -Golgi no fragmentado -Núcleo con escasa alteración	0%	<1%	3 %	4%	90%	3%	80%

Tabla 2 Cuantificación mediante MF de los cambios estructurales producidos por el virus *wt* y por los virus intra- y extra-celulares que se han multiplicado en presencia de RBV.

Cuantificación de las modificaciones estructurales sufridas en las células infectadas y porcentaje de células con señal para la proteína viral Gc en células infectadas con VBUN en presencia o ausencia de RBV, en comparación con células Vero infectadas con los virus intra y extracelulares obtenidos de cultivos tratados con RBV. Se infectó a 1 y 10 UFP/célula a 10 h.p.i., en presencia o ausencia de RBV.

Cuando las células Vero eran infectadas a 1 UFP/célula a 10 h.p.i. con los virus que habían sido capaces de propagarse en presencia de RBV, el título viral de los virus extracelulares obtenido era más bajo que el obtenido con el virus *wt*. Cuando se infectaban células Vero a 1 UFP/célula con estos virus, y se les añadía de nuevo 50 µg/ml de RBV, se obtenía un título aún menor (Figura 26).

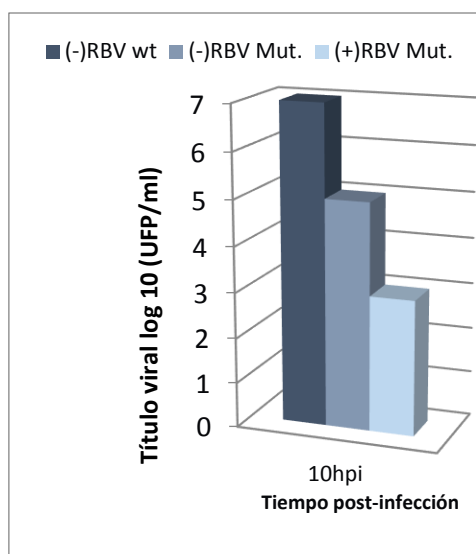


Figura 26. Gráfica comparativa de las titulaciones virales.

Células Vero infectadas a 1 UFP/célula, 10 h.p.i. con virus *wt* (azul oscuro), con virus mutados (*mut*) que habían conseguido multiplicarse en presencia de RBV (gris) y con virus mutados a los que se les vuelve a añadir 50 µg/ml de RBV (azul claro).

Los estudios de *western blot* mostraron inhibición en la síntesis de proteínas virales cuando las células Vero eran infectadas a 1 UFP/célula a 10 h.p.i. con estos virus mutados (Figura 27). Gc resulta inapreciable y N apenas se aprecia (Figura 27 A). Cuando las condiciones eran forzadas a ~10 UFP/célula, se obtiene una señal clara de Gc y N. Cuando se infectaban las células con estos virus y eran tratadas de nuevo con 50 µg/ml de RBV, se obtuvo una escasa expresión de las proteínas virales. Gc casi no es apreciable (Figura 27 B).

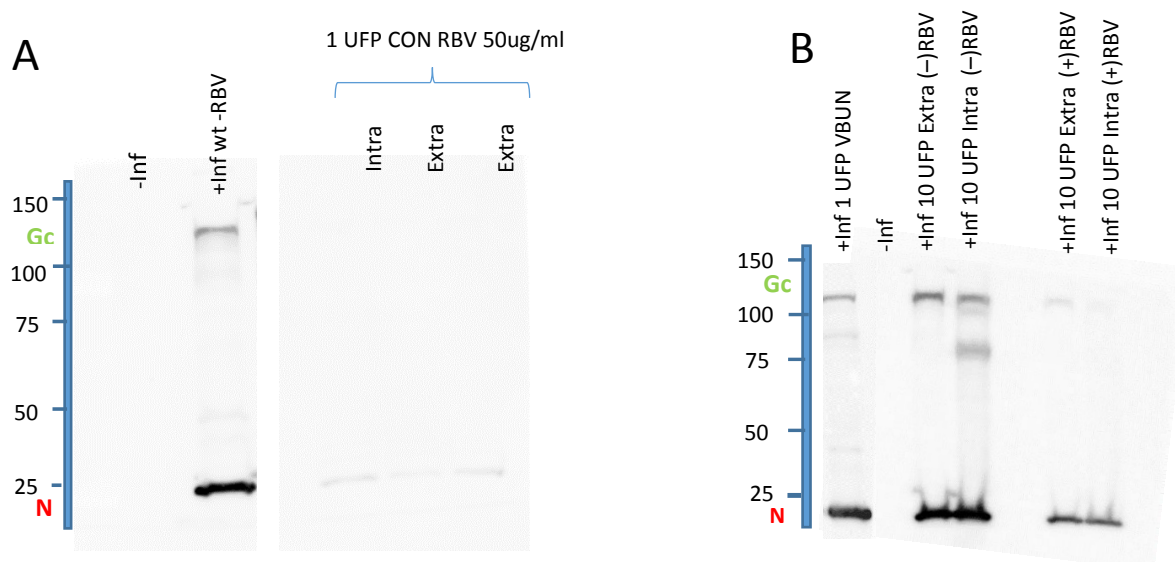


Figura 27 Estudios de *western blot* de células Vero infectadas con los virus que resultaron ser capaces de propagarse en presencia de RBV.

Detección de Gc y N mediante *western blot* en células Vero. (A) Células Vero infectadas a 1 UFP/célula a 10 h.p.i. con los virus intra y extracelulares que habían sido capaces de propagarse en presencia de RBV y que han sido incubados de nuevo con RBV. (B) Células Vero infectadas a 10 UFP/célula a 10 h.p.i. con los virus que habían sido capaces de propagarse en presencia de RBV y que en un segundo pase no se han vuelto a tratar con RBV y células que de nuevo fueron tratadas con RBV.

Para valorar el estado estructural de las células infectadas con los virus que sobreviven a RBV, se realizaron estudios de ME. Cuando las células se infectaron a 10 UFP/célula a 10 h.p.i., se obtuvieron cambios estructurales discretos (Figura 28 A). Se observa un Golgi fragmentado, pero no disperso, agrupado junto al núcleo (Figura 28 B). El 75% de los ORs estaban alterados estructuralmente (Figura 28 A recuadro), y se observa un número escaso de virus intra- y extracelulares. Cuando se infectaba con estos virus mutados y de nuevo se le añadía RBV, apenas se apreciaron cambios morfológicos en las células estudiadas (Figura 28 C). El Golgi aparece agrupado y el citoplasma no presenta cambios estructurales significativos (Figura 28 D). Los núcleos y nucléolos no presentan cambios morfológicos aparentes (Figura 28 E).

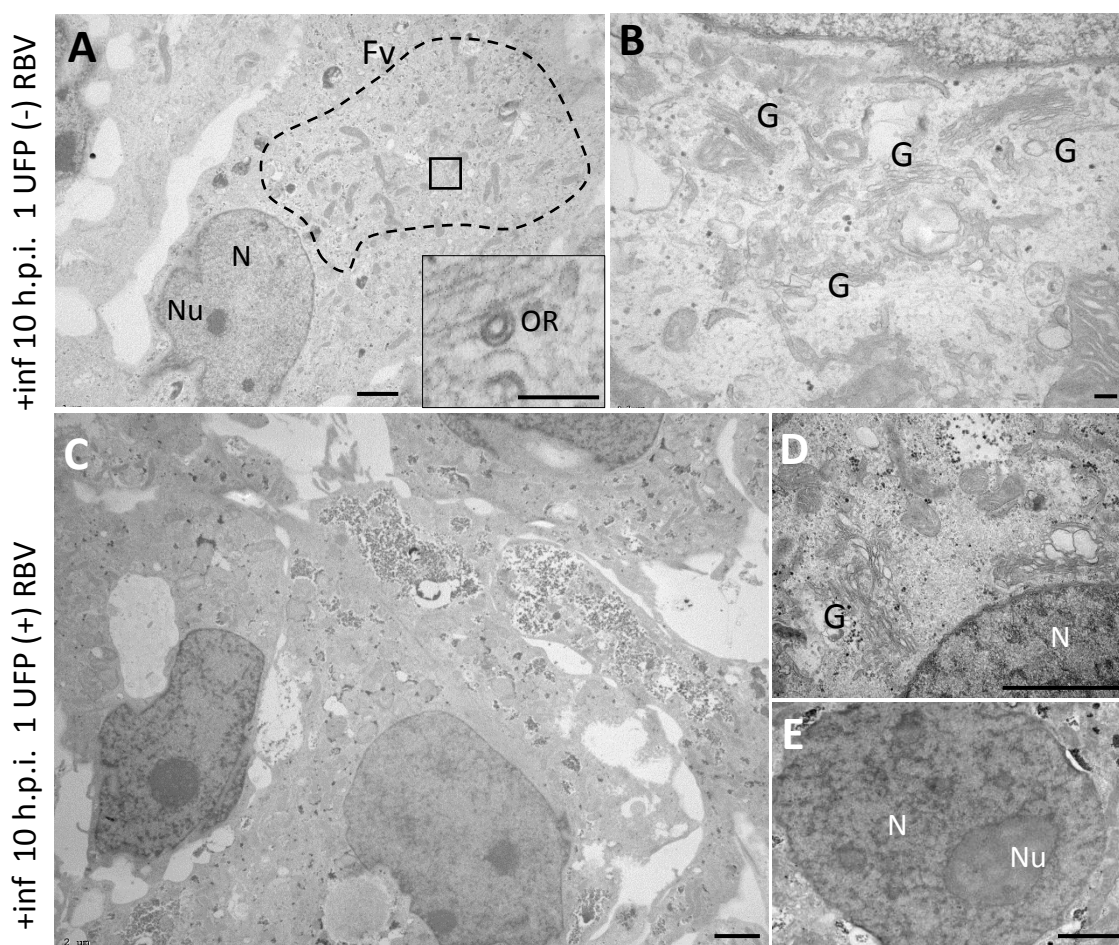


Figura 28 ME de células Vero infectadas por virus que se multiplicaron en presencia de RBV.

(A-E) ME de secciones ultrafinas orientadas de células Vero infectadas a 1 UFP/célula a 10 h.p.i. con virus que han sido capaces de propagarse en presencia de RBV. (A) Célula a baja magnificación, alteraciones estructurales poco marcadas, con un núcleo y nucléolo ligeramente alterados. Factoría viral (Fv) con un OR poco denso o vacío (recuadro). (B) Detalle del Golgi (G) fragmentado, pero no disperso. (C-E) Células Vero infectadas con virus que se propagó en presencia de RBV, a 1 UFP/célula, fijadas a 10 h.p.i. y tratadas de nuevo con RBV. (C) Las células a baja magnificación no muestran alteraciones. (D) Citoplasma sin alteraciones y sin elementos virales, con un Golgi sin fragmentar. (E) Núcleo y nucléolo normales. Barras: 2 μ m en (A, C, D, E); 0,2 μ m en B y recuadro en A.

Para cuantificar las estructuras virales encontradas en células infectadas con los virus que resultaron capaces de multiplicarse en presencia de RBV se estudiaron una gran parte de las secciones de 111 células infectadas por estos virus mutados, cuantificando todos los elementos virales encontrados, así como los cambios morfológicos que la infección había inducido en las células. Los resultados se resumen en la Tabla 3.

Estructuras virales y morfología celular	Células Vero infectadas a 1 UFP/célula con BUNV 10 h.p.i. (-)RBV	Células Vero infectadas a 10 UFP/célula con virus que han sido capaces de propagarse en presencia de RBV.
Nº células	60	111
Infec/no infec	58/2 (96%)	15/96 (14%)
Virus intracelulares	170	9
Virus extracelulares	600	3
ORs totales	52	8
ORs alterados	2	6
Golgi fragmentado	59	15
Dominios tubulares de ORs	5	0
Estructuras membranosas con virus	15	0
Núcleo alterado	55 (92%)	13 (11,7%)
Núcleo alterado	55 (92%)	13 (11.7%)
Citoplasma alterado	56 (93%)	15 (13.5%)

Tabla 3 Cuantificación mediante ME de estructuras virales y cambios morfológicos celulares en células Vero infectadas con VBUN y con virus capaces de replicarse en presencia de RBV.

La cuantificación muestra cómo se reduce de forma importante el porcentaje de infección en células tratadas con RBV frente a las células no tratadas con RBV. Sin embargo, y pese a ser virus que al haber estado previamente en contacto con RBV resultan menos dañinos para la célula, se han conseguido multiplicar. Esto refuerza la idea de que estos virus han adquirido mutaciones que están alterando su capacidad de replicación, permitiéndoles multiplicarse en presencia de RBV, aunque en cantidades menores. Esto probablemente se relaciona con el hecho de que los virus mutados han cambiado el compartimento celular en el que ensambla su factoría y que deja de ser el *cis*-Golgi, lo cual probablemente provoca cambios en la eficacia de su multiplicación.

3.- Nanopartículas de plata AgNPs.

Como se ha descrito en la introducción, las nanopartículas de plata (AgNPs) han demostrado tener potencial antiviral y por lo tanto han atraído la atención dentro del campo de la virología en la última década (Baram-Pinto y cols., 2009; Borrego y cols., 2016). Hasta la fecha los estudios sobre el uso de AgNPs en virología son escasos. Se han propuesto varios mecanismos de acción de las AgNPs que podrían explicar su efecto antiviral (Elechiguerra y cols., 2005; Lara y cols., 2010a; Xiang y cols., 2013). En este estudio se ha analizado su eficacia frente a VBUN en células Vero mediante técnicas de imagen, titulación viral y *western blot*.

3.1.- Estudio del efecto antiviral de AgNPs en células Vero infectadas con VBUN.

Los ensayos de toxicidad que se encuentran en la literatura muestran que las partículas de plata más pequeñas (3 nm) son más tóxicas que aquellas de mayor tamaño (Yen y cols., 2009). En células Vero está descrito que las AgNPs de 10 nm a concentraciones altas (entre 50-100 $\mu\text{g/mL}$) producen un decrecimiento del 25-60% en la viabilidad celular (Speshock JL y cols., 2010). En este trabajo se estudiaron diferentes concentraciones (1,5, 2, 2,4, 6, 12 y 24 $\mu\text{g/ml}$) de AgNPs con 10 nm de diámetro en cultivos de células Vero sin infectar e infectadas.

Las células Vero se infectaron a 1 UFP/célula y a 1 hora de post-infección se añadieron las AgNPs a diferentes concentraciones. Estas muestras fueron fijadas a 10 h.p.i. Las titulaciones del virus extracelular mostraron una disminución en el título viral en los cultivos tratados con AgNPs con respecto a las células infectadas y no tratadas, que presentan títulos $\sim 10^7$ - 10^8 UFP/ml (Figura 29 A). A concentraciones más bajas (1,5 $\mu\text{g/ml}$) el título viral disminuye en 2 unidades logarítmicas, mientras que a la dosis mayor (24 $\mu\text{g/ml}$) se observa una disminución de 4 unidades logarítmicas con respecto a las células infectadas y no tratadas (Figura 29 A). Esta inhibición resultaba mayor cuando las células habían sido pre-tratadas durante 30 minutos con las diferentes concentraciones de AgNPs, infectadas con VBUN a 1 UFP/célula y a continuación se añadía de nuevo AgNPs y se fijaba a 10 h.p.i. (Figura 29 A). Se realizaron estudios de *western blot*, que mostraron una disminución de las proteínas virales Gc y N acorde con lo observado en las titulaciones virales, siendo también más evidente en aquellas células que habían sido pre-tratadas con AgNPs (Figura 29 B).

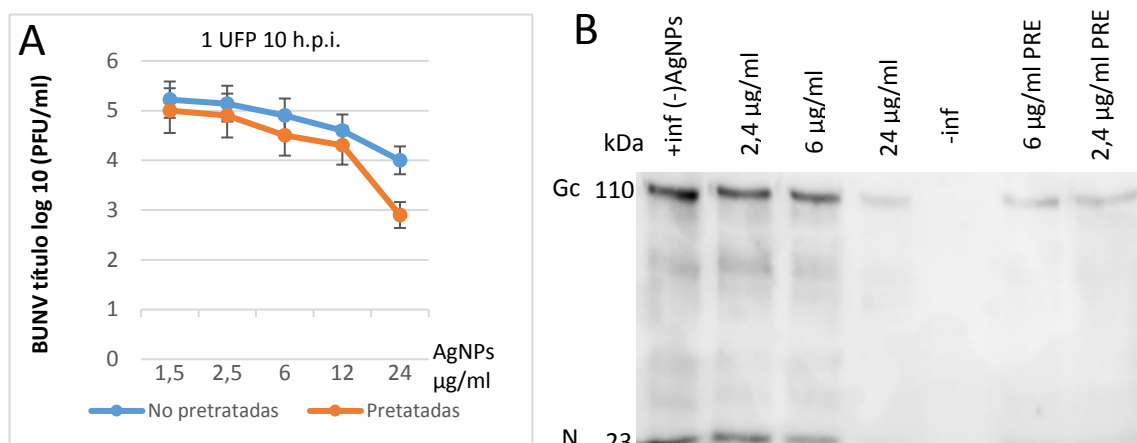


Figura 29. Medida de infectividad en los sobrenadantes y *western blot* de células Vero con y sin tratamiento con AgNPs.

(A) Infectividad en los sobrenadantes de los cultivos de células Vero infectadas a 1 UFP/célula a 10 h.p.i. tratadas con diferentes concentraciones de AgNPs (1.5, 2.5, 6, 12, 24 µg/ml) con y sin pre-tratamiento adicional con AgNPs. Los datos mostrados son representativos de al menos tres experimentos independientes. (B) Detección de las proteínas N y Gc mediante *western blot* en células Vero infectadas a 1 UFP/célula a 10 h.p.i. con VBUN y tratadas con AgNPs con o sin pre-tratamiento adicional a diferentes concentraciones de AgNPs.

3.2.- Las AgNPs se unen a VBUN *in vitro*.

Para ver la posible interacción directa que pudieran tener las AgNPs con las partículas virales, se realizó una tinción negativa y ME de virus sin AgNPs (Figura 30 A) y de virus incubados con AgNPs durante 5 minutos (Figura 30 B). Se eligió un tiempo corto ya que tiempos mayores podrían provocar la destrucción del virión por parte de las AgNPs. Como muestra la Figura 30 B, se detecta la unión de las AgNPs a los virus, encontrando numerosas partículas de plata adheridas a las partículas virales (Figura 30 B, flechas). La incubación con AgNPs cambió la calidad de las tinciones negativas y las partículas virales aparecen con “tinción positiva”.

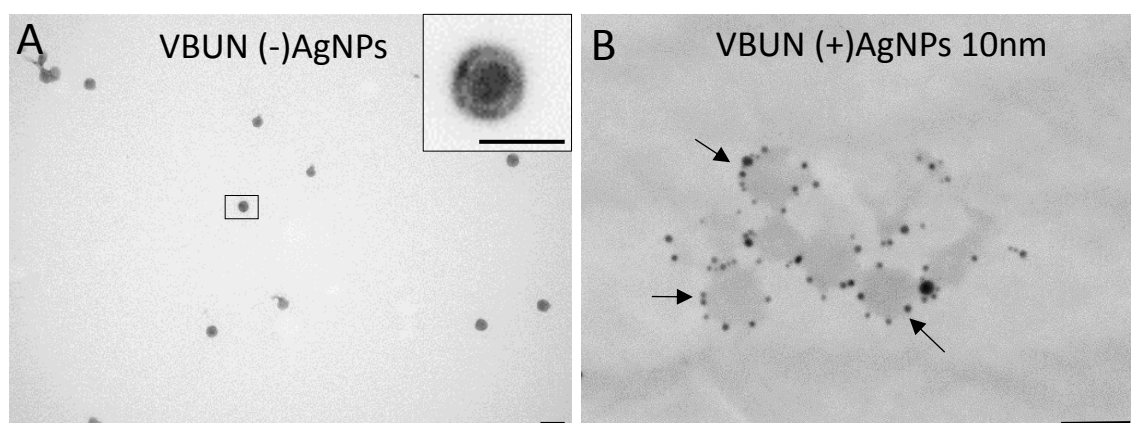
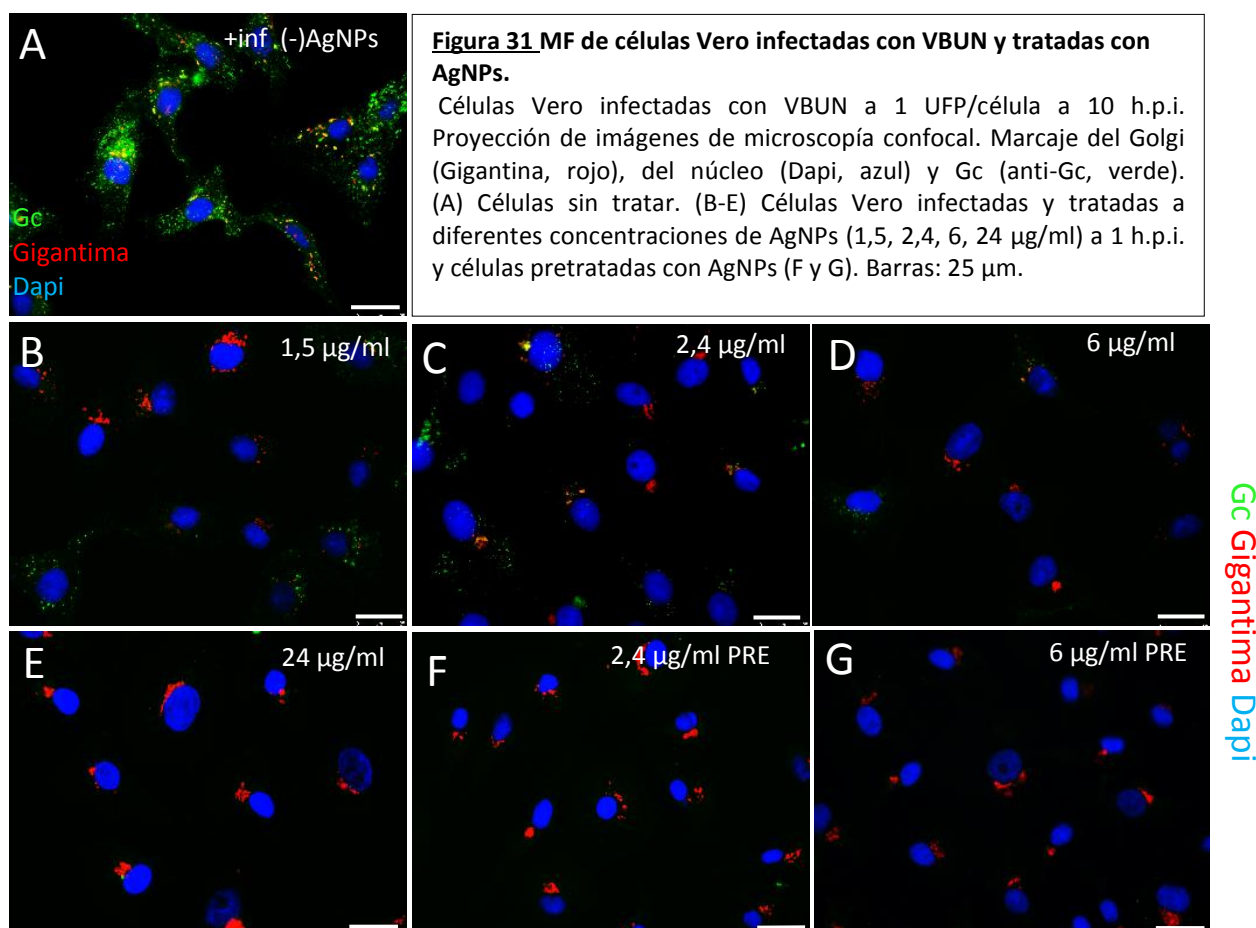


Figura 30 Tinción negativa y TEM de VBUN sin y con incubación con AgNPs

(A) Tinción negativa VBUN sin AgNPs. Partícula viral a mayor magnificación (recuadro). (B) Tinción negativa de VBUN incubados 5 minutos con AgNPs. Las partículas de plata se adhieren a la superficie de los virus (flechas). Barras: 200 nm en A; 100 nm recuadro en A y B.

3.3.- MF de células Vero infectadas con VBUN y tratadas con AgNPs.

Se realizaron estudios de microscopía de fluorescencia a diferentes concentraciones de AgNPs, añadidas a 1 h.p.i. en células Vero infectadas a 1 UFP/célula y fijadas a 10 h.p.i. Sobre un total de 500 células estudiadas se observó una disminución considerable de la infección viral, con una inhibición del 60% en el número de células infectadas a la concentración más baja de AgNPs (1,5 $\mu\text{g/ml}$) y de 90 - 95% a las concentraciones más altas (6-24 $\mu\text{g/ml}$) (Figura 31). Cuando las AgNPs se añadían 30 minutos antes de realizar la infección viral y se añadían posteriormente tras 1 h.p.i. se obtuvieron inhibiciones de la infección del 95%; apenas se detecta señal de proteína viral y las células muestran un aspecto normal, con nucléolos visibles y Golgi sin fragmentar (Figura 31 F y G).



3.4.- ME de células Vero infectadas con VBUN y tratadas con AgNPs.

Se realizaron estudios de ME en células Vero sin infectar y tratadas con AgNPs y en células Vero infectadas y tratadas con AgNPs cuyo objetivo fue evaluar los posibles efectos de las AgNPs a nivel subcelular.

Para ello se utilizaron células Vero sin infectar e infectadas a 1 UFP/célula, se fijaron a las 10 h.p.i. y las AgNPs se añadieron 30 minutos antes de fijar las células. En el caso de las células infectadas se decidió añadir las AgNPs a tiempos largos de post-infección para que VBUN pudiera ensamblar sus factorías virales y por lo tanto poder valorar el efecto que podrían tener las AgNPs sobre los elementos que componen la factoría viral. También para evitar que las AgNPs pudieran ser acumuladas o excretadas por parte de la célula y no fueran observables en la ME. Inicialmente los cortes fueron teñidos según el protocolo estándar, lo cual permite ver el estado general de la célula, pero resulta más difícil visualizar las AgNPs, que quedan enmascaradas por los agentes de tinción. Para resolver este problema, se intentó aumentar el diámetro de las AgNPs incubando las secciones con sales de plata, lo que se conoce como “*silver enhancement*”. El resultado no fue óptimo porque se formaban precipitados de plata inespecíficos. Finalmente se optó por realizar ME de cortes ultrafinos orientados sin teñir, con los que se obtuvo un contraste suficiente en ausencia de agentes de tinción (Figura 32), lo que nos ha permitido detectar las AgNPs de forma precisa y sin interferencia alguna. En las muestras de ME en las que se usó AgNPs a una concentración de 6 µg/ml durante 30 minutos antes de ser fijadas, se detectó que tanto en células infectadas como en las no infectadas las partículas se encontraban en el interior de la célula preferentemente y no se detectaron unidas a la membrana plasmática (Figura 32 A-C). En el interior celular se acumulaban en el núcleo (Figura 32 A, flechas) y mitocondrias (Figura 32 B, flechas) de las células no infectadas. De igual manera en las células infectadas, las AgNPs se localizaron en el núcleo (Figura 32 C y D) y en mitocondrias (Figura 32 E, flecha azul y 32 F, flechas negras). Muchas AgNPs se encontraron agrupadas alrededor de la factoría viral, donde también se observaron unidas a las esférulas de los ORs (Figura 32 E, flechas negras y G flecha roja). Se muestra por lo tanto, una interacción directa de las partículas de plata con los ORs y con otros orgánulos como las mitocondrias, que componen la factoría viral y cuya alteración podría estar comprometiendo elementos necesarios para la replicación viral. Otro dato interesante es que en las células infectadas y tratadas con AgNPs, se producía una mayor acumulación de ORs, donde también se localizaba, como ya se ha mencionado, una mayor concentración de AgNPs (Figura 32 G). Cuando se estudiaron cortes teñidos de las mismas condiciones, también se pudo observar que algunas células formaban estas agrupaciones de ORs (Figura 32 H).

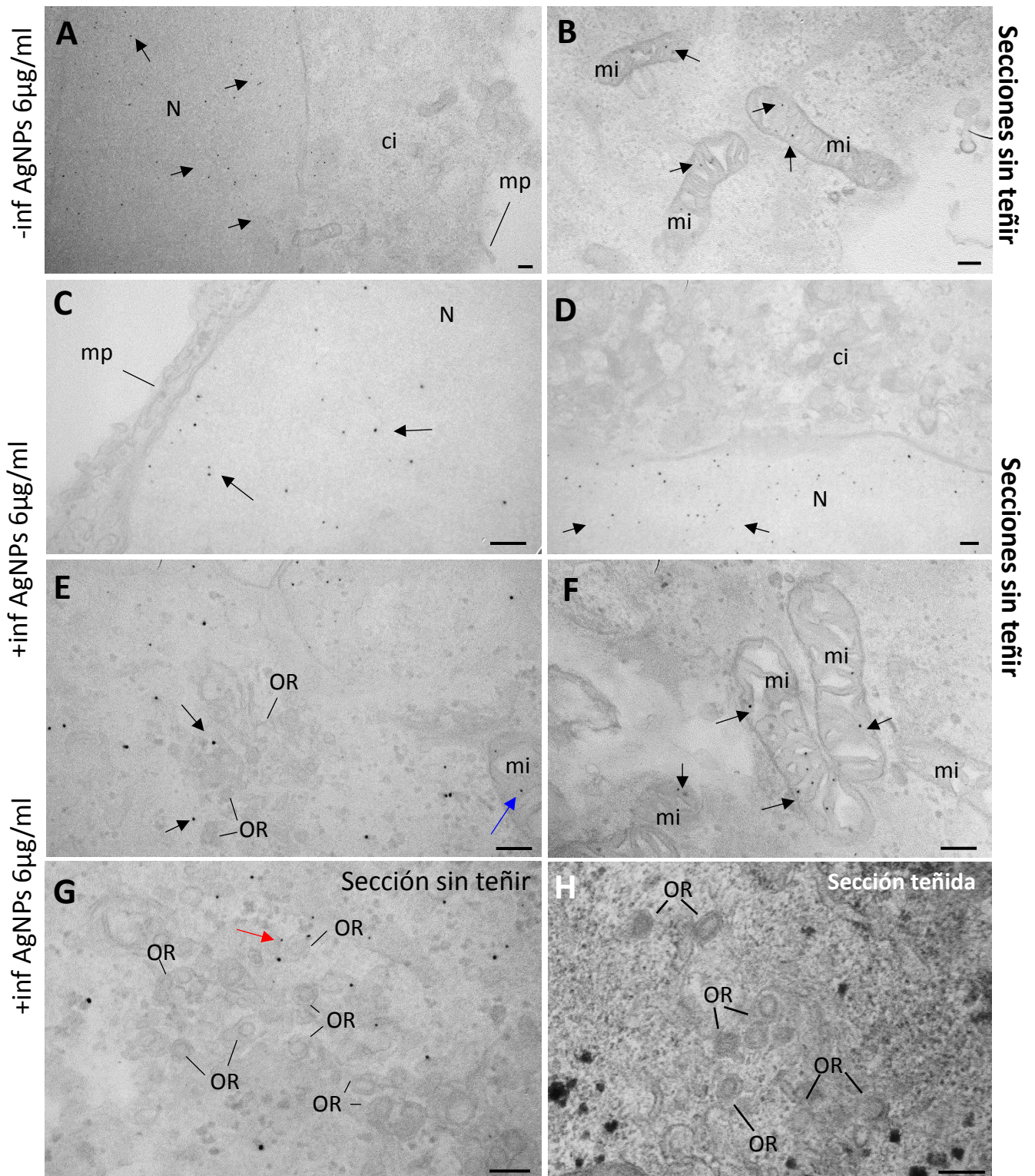


Figura 32 ME de secciones ultrafinas de células Vero infectadas con VBUN y tratadas con AgNPs.

(A-G) Secciones ultrafinas orientadas sin teñir de células Vero; (A-B) sin infectar; (C-H) infectadas con VBUN a 1 UFP/célula fijadas a las 10 h.p.i. y tratadas con AgNPs 6 µg/ml 30 minutos antes de ser fijadas. (A) Acumulación de partículas en el núcleo (flechas), no se detectan en membrana plasmática (mp) ni en citoplasma (ci). (B) Acumulación de partículas en las mitocondrias (flechas). (C y D) Acumulación de partículas en el núcleo (flechas) de células infectadas, no se detectan en membrana plasmática (mp) ni en citoplasma (ci). (E) AgNPs cerca de las esférulas de los ORs (flechas negras) y en mitocondria (flecha azul). (F) AgNPs en mitocondrias de células infectadas (flechas). (G) Agrupación de ORs, donde las AgNPs se localizan cerca de las esférulas; algunas partículas de plata aparecen unidas a las esférulas de los ORs (flecha roja). (H) Sección teñida, mostrando una agrupación de ORs. Barras: 200 nm.

3.5.- Las AgNPs se unen a las partículas virales en células Vero.

Las células Vero fueron infectadas a 1 UFP/célula, fijadas a 10 h.p.i. y tratadas con AgNPs (6-24 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 30 minutos antes de fijar las células. Se estudiaron los virus extracelulares y se pudo observar que a diferencia de los virus extracelulares en células no tratadas con AgNPs (Figura 33 A), la mayoría de los virus extracelulares tratados con AgNPs se encontraban deformados y muchos estaban visiblemente alterados (Figura 33 B-F). Algunos virus presentaban AgNPs adheridas a su superficie (Figura 33 B-F, flechas). En cuanto a los virus intracelulares, no se observaron anomalías estructurales evidentes como las observadas en los virus extracelulares.

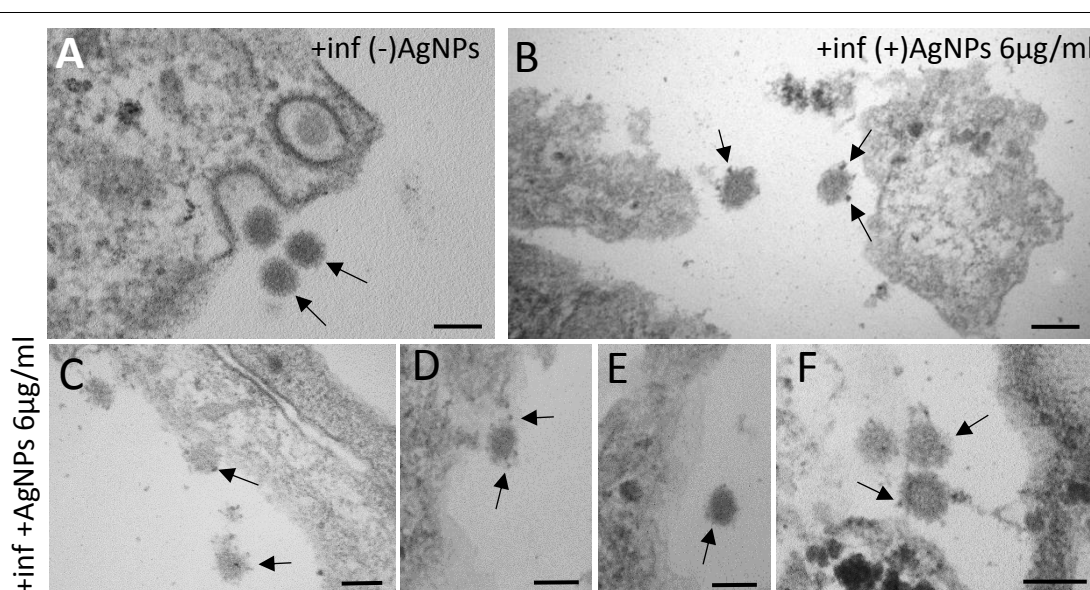


Figura 33 ME de virus extracelulares en cultivo de células Vero infectadas por VBUN e incubados con AgNPs

ME de secciones ultrafinas orientadas de células Vero infectadas por VBUN a 1 UFP/célula y fijadas a las 10 h.p.i. (A) Virus extracelulares (flechas) de células Vero infectadas en ausencia de AgNPs. (B-F) Virus extracelulares de células tratadas con 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ AgNPs 30 minutos antes de ser fijadas a las 10 h.p.i. Virus extracelulares con AgNPs adheridas a su superficie (flechas), y morfología alterada. Barras 100 nm.

Cuando las células Vero fueron infectadas a 1 UFP/célula, fijadas a 10 h.p.i. y las AgNPs se añadieron a 1 h.p.i. a una concentración de 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, se obtuvo que de 15 células estudiadas mediante ME, 13 células presentaban aspectos cercanos a la normalidad sin signos de infección (Figura 34 A). En algunos casos el nucléolo estaba ligeramente alterado (Figura 34 B, flecha, recuadro y C). Pese a que las concentraciones de AgNPs usadas en este trabajo no afectaban a la viabilidad celular, encontramos diferencias significativas entre las mitocondrias de las células Vero no tratadas (Figura 34 D) y las tratadas con concentraciones $>6 \mu\text{g}/\text{ml}$ de

AgNPs, las cuales se encontraban hinchadas y con alteraciones en las crestas mitocondriales (Figura 34 E). También se encontraban alteradas las mitocondrias de las células infectadas y tratadas con dosis $>6 \mu\text{g/ml}$ AgNPs (Figura 34 F).

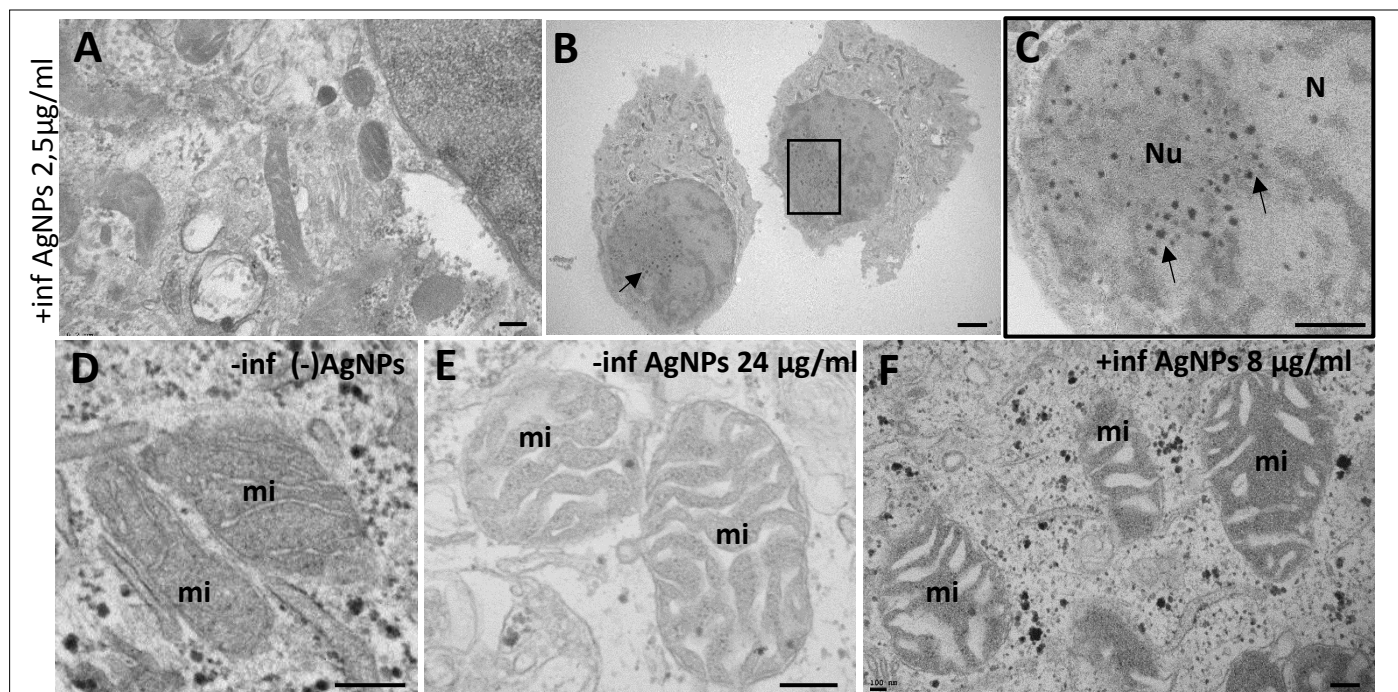


Figura 34 ME de secciones ultrafinas teñidas de células Vero control o infectadas con VBUN y tratadas con AgNPs.

(A-C) Las células Vero se infectaron con VBUN a 1 UFP/célula, fueron tratadas con AgNPs $2,5 \mu\text{g/ml}$ a la hora de post-infección y se fijaron a las 10 h.p.i. (A) Célula sin signos de infección ni toxicidad aparente. (B) Imagen a baja magnificación de células con un nucleólo ligeramente alterado (flecha y recuadro). (C) Imagen a mayor magnificación donde se muestra en detalle el nucleólo alterado con la presencia de pequeños gránulos densos (flechas). (D) Mitocondrias (mi) en una célula sin infectar y sin tratar. (E) Las mitocondrias (mi) de una célula tratada y sin infectar están hinchadas y con las crestas mitocondriales alteradas. (F) Las mitocondrias (mi) de una célula infectada con VBUN y tratada con AgNPs están hinchadas y con alteración en las crestas mitocondriales. Barras $0,2 \mu\text{m}$ en (A, D, E, F); $2 \mu\text{m}$ en B y C.

Cuando se estudiaron de nuevo por ME células infectadas a 1 UFP/célula, tratadas con $6 \mu\text{g/ml}$ de AgNPs añadidas a 1 h.p.i. y fijadas a 10 h.p.i. (Figura 35), se obtuvo que de 20 células estudiadas, 3 células presentaban signos de infección discretos. En estas células, las esférulas de los ORs tienen una estructura alterada en comparación con los ORs formados en células infectadas y no tratadas con AgNPs (Figura 35 A). Las esférulas de células tratadas con AgNPs presentan un contenido poco denso y parecen estar vacías, algunas están hinchadas y deformes (Figura 35 B, C y D). Junto con la unión de las AgNPs a los ORs mostrada en la Figura 32, estos datos sugieren que las AgNPs actúan directamente alterando las esférulas de

los ORs y en consecuencia afectando al orgánulo de replicación del virus, así como a las mitocondrias, orgánulo que el virus recluta en su factoría.

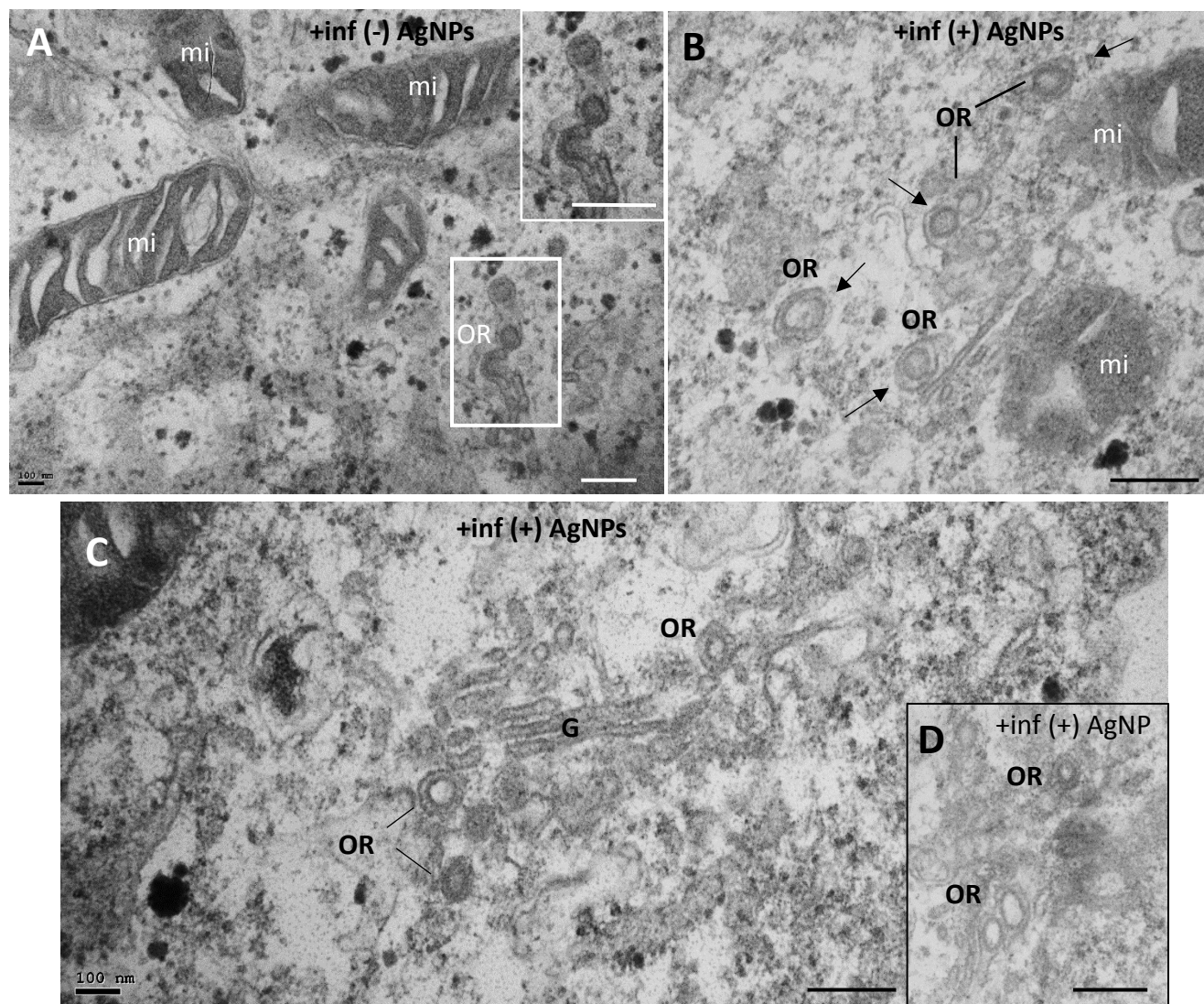


Figura 35 ME de los ORs de células Vero infectadas con VBUN y tratadas con AgNPs.

ME de secciones ultrafinas orientadas de células Vero infectadas con VBUN a 1 UFP/célula a 10 h.p.i.. (A) Imagen de una factoría viral en célula infectada y no tratada donde se observan los ORs sin alterar. (B-D) Células tratadas con 6 $\mu\text{g/ml}$ AgNPs añadidas a 1 h.p.i. y fijadas a 10 h.p.i. (B) Detalle de la factoría viral de una célula tratada con AgNPs. Las esférulas de los ORs están alteradas (flechas). (C y D) Esférulas de los ORs con morfología alterada. Mitocondrias (mi); Golgi (G). Barras: 200 nm.

3.6.-A tiempos largos de tratamiento, las AgNPs se acumulan en orgánulos membranosos intracelulares.

Los estudios de las secciones ultrafinas mediante ME han mostrado que las AgNPs son capaces de alterar las estructuras virales, así como los orgánulos celulares. Inicialmente el estudio de secciones ultrafinas sin teñir a tiempos cortos de tratamiento con AgNPs nos reveló que las AgNPs se acumulan en el núcleo, mitocondrias, en la factoría viral y alrededor de los ORs. Para

estudiar la localización intracelular de las AgNPs a tiempos más largos de tratamiento, se infectaron las células Vero a 1 UFP/célula, a la hora de post-infección se añadieron diferentes concentraciones de AgNPs (2,4, 6, 12 y 24 $\mu\text{g/ml}$) y se fijaron a las 10 h.p.i. Como ya se ha mostrado anteriormente mediante ME, observamos que con estos tratamientos el estado de las células es cercano a la normalidad, la mayoría de células no presenta estructuras virales (Figura 36 A y B) con la salvedad de que las mitocondrias, a concentraciones $>6\mu\text{g/ml}$ ofrecen un aspecto alterado (Figura 36 C). Las secciones ultrafinas sin teñir, mostraron que las AgNPs a tiempos largos de tratamiento, se acumulan en orgánulos membranosos (Figura 36 D y E) no encontrándose en ningún otro orgánulo celular, ni siquiera cerca de los ORs. Esta acumulación de AgNPs en orgánulos membranosos se produce de igual manera en células no infectadas e incubadas con AgNPs (Figura 36 F y G). La célula por lo tanto es capaz de almacenar estas partículas en el interior de orgánulos membranosos que por su morfología podrían ser lisosomas.

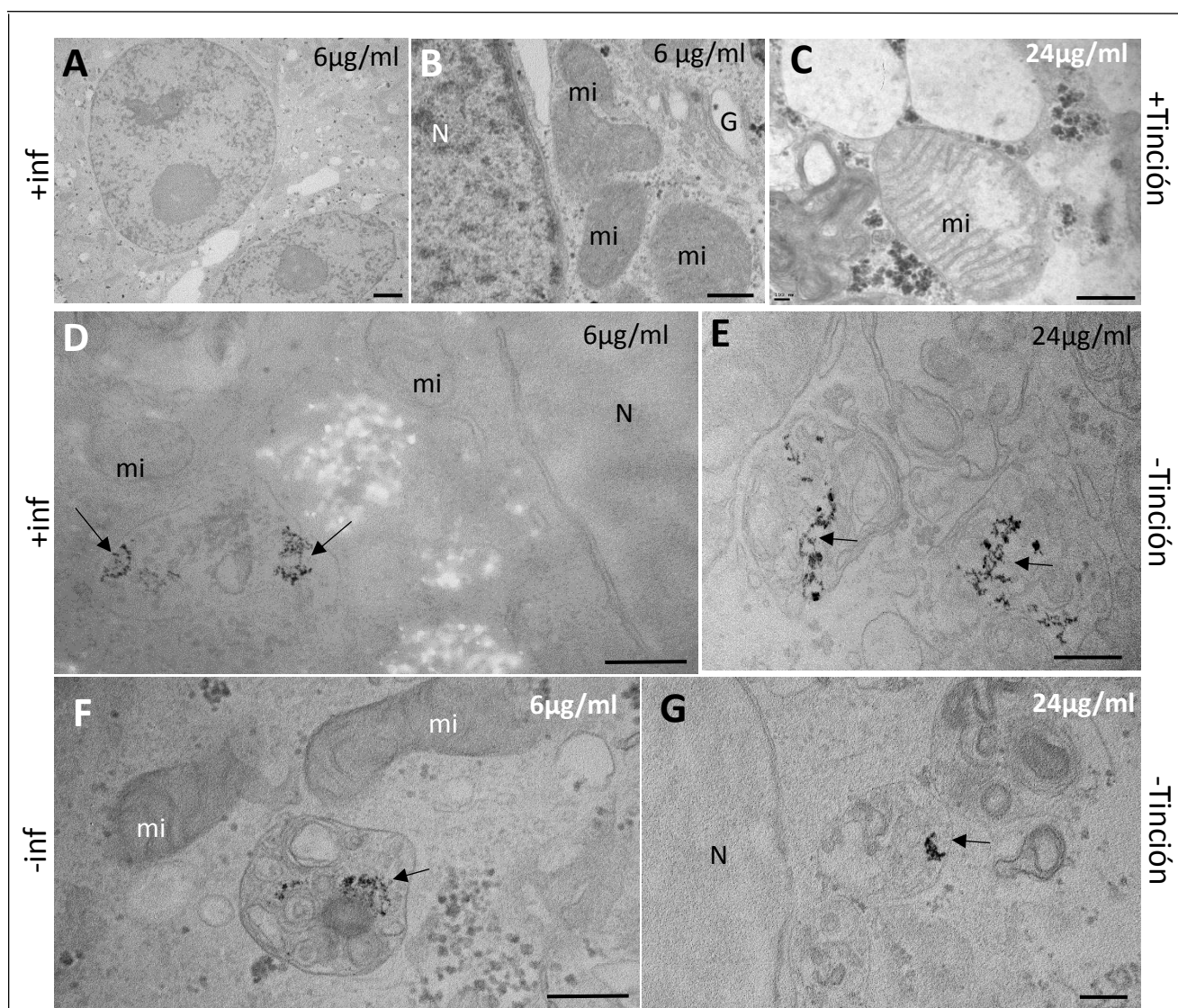


Figura 36 ME de células Vero incubadas con AgNPs a tiempos largos de tratamiento.

(A-E) ME de secciones ultrafinas orientadas de células Vero infectadas por VBUN a 1 UFP/célula, tratadas con 6 ó 24 $\mu\text{g/ml}$ de AgNPs y fijadas a 10 h.p.i. (A y B) Imagen a baja y alta magnificación respectivamente de células que muestran una apariencia normal. (C) Imagen a alta magnificación donde se muestran las mitocondrias alteradas. (D - E) Acúmulos de AgNPs en el interior de orgánulos membranosos (flechas); el resto de orgánulos y estructuras celulares no tienen AgNPs. (F y G) Células sin infectar y tratadas con 6 ó 24 $\mu\text{g/ml}$ AgNPs y fijadas a las 10 horas post-tratamiento. Acúmulos de AgNPs en orgánulos membranosos (flechas). Núcleo (N); mitocondria (mi). Barras: 2 μm en A; 0,4 μm en B-G.

Los resultados han mostrado una gran eficacia de las AgNPs en la inhibición de VBUN en células Vero. Las AgNPs podrían estar interfiriendo en el proceso de entrada del virus en la célula, ya que se ha mostrado cómo las AgNPs son capaces de unirse a las partículas virales en el medio extracelular y alterarlas estructuralmente. También se ha mostrado que podrían estar actuando a nivel de replicación viral, ya que por primera vez se ha observado que las AgNPs son capaces de alterar estructuralmente las esférulas de los ORs que albergan los CRs. Sin embargo también se ha mostrado que con las dosis más altas, pese a que la viabilidad celular no se ve alterada significativamente, se producen alteraciones en la ultraestructura celular. Las mitocondrias sufren una marcada alteración estructural, lo que podría afectar procesos celulares importantes para un correcto funcionamiento de la célula.

Discusión

Las enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes son la principal causa de muerte en el mundo. Una gran parte de estas enfermedades son causadas por virus patógenos. En la actualidad, la mayoría de estas enfermedades carecen de tratamiento alguno. Pese a que hoy en día encontramos numerosos compuestos que han mostrado tener eficacia antiviral, apenas 90 compuestos antivirales están aprobados para el tratamiento de 9 enfermedades causadas por virus en humanos (De Clercq E y Li G, 2016). Responden a las necesidades clínicas causadas por los virus emergentes pasa por aplicar y combinar nuevas estrategias para combatirlos, tales como el uso de antivirales de amplio espectro, el reposicionamiento de fármacos, o el uso de compuestos que tienen como blanco elementos del hospedador. Para evaluar la eficacia de estos compuestos antivirales, es de vital importancia conocer en profundidad su funcionamiento a nivel celular, conocimientos que pueden derivar en una mejora de su rentabilidad, tanto en tiempo como en costes.

El objetivo principal de este trabajo ha sido estudiar la capacidad antiviral de Ribavirina y Nano-partículas de plata en células infectadas con un bunyavirus. Para ello en primer lugar se estudió la infección del bunyavirus en células Vero, una línea celular ampliamente utilizada para crecer virus y analizar antivirales, y que no habían sido estudiadas con detalle en nuestro laboratorio.

1.- Estudio de la infección de VBUN en células Vero.

En esta tesis en primer lugar se ha estudiado en detalle la factoría viral ensamblada por VBUN en células Vero. Junto con los elementos ya descritos en trabajos anteriores y realizados por nuestro grupo, se ha mostrado que la infección de VBUN presenta diferencias significativas en diferentes líneas celulares. La infección de VBUN en células BHK-21 produce una factoría grande y única en la zona perinuclear con un engrosamiento sin fragmentación del Golgi (Salanueva y cols., 2003; Novoa y cols., 2005a; Fontana y cols., 2008), a diferencia de lo que ocurre en células Vero, en las que el Golgi se fragmenta y dispersa, formando factorías pequeñas de carácter funcional.

Vero es una línea celular de mono que, a diferencia de las líneas celulares humanas, produce una gran cantidad de virus antes de mostrar un efecto citopático severo. Esto ha permitido un estudio estructural a tiempos largos de post-infección. Otro aspecto importante es que Vero, es una de las líneas celulares más usadas para estudiar compuestos antivirales. Además, se dispone de un buen número de marcadores celulares, que han facilitado la caracterización de la infección en esta línea celular.

En los estudios realizados se ha observado que a tiempos cortos de post-infección (4-6 h.p.i.) los cambios estructurales inducidos por VBUN en las células Vero resultaban muy discretos y en un escaso número de células, lo que dificultaba la realización de un estudio comparativo en detalle. Se optó por usar un tiempo más largo de post-infección (10 h.p.i.). A este tiempo se encuentran todos los cambios inducidos por el virus en la célula y sin daño significativo ni muerte celular, pero sí cambios drásticos en la estructura de la célula, que tiene un contenido bastante vacío y numerosas mini-factorías repartidas por todo el citoplasma celular. El aparato de Golgi que contiene múltiples ORs se encuentra fragmentado y disperso por todo el citoplasma. Se observa además un reclutamiento masivo de orgánulos celulares, concretamente de mitocondrias y RER alrededor del aparato de Golgi.

Hasta la fecha desconocemos qué elementos podrían estar participando en la fragmentación del Golgi, que parece no estar mediada por alteraciones en el citoesqueleto (Salanueva y cols., 2003), pero al igual que en células en mitosis, podría deberse a la activación de proteínasquinasas (Calderita y Risco, resultados no publicados). Sin embargo, la fragmentación del aparato de Golgi en células Vero infectadas con VBUN es claramente diferente a la que se produce en las células durante la mitosis. La fragmentación del Golgi durante la mitosis es necesaria para el reparto del orgánulo entre las dos células hijas, la progresión del ciclo celular y la dispersión de las moléculas de señalización asociadas a Golgi. En las células en división, el aparato de Golgi sufre un proceso de fragmentación estrechamente regulado, que forma pequeños grupos de túbulos y vesículas que ya no tienen la estructura *cis-trans* ni orgánulos adheridos. Sin embargo, en las células Vero infectadas con VBUN, tras la fragmentación se producen unidades pequeñas del aparato de Golgi que siguen manteniendo la estructura *cis-trans* y presentan orgánulos asociados.

En la bibliografía encontramos que algunos virus son capaces de fragmentar el Golgi en distintas líneas celulares. En el caso de picornavirus, la fragmentación del Golgi en células Vero produce una inhibición tanto del tráfico de proteínas celulares como de su secreción, provocando que éstas se acumulen en el Golgi (Zhou Z y cols., 2013). Esta situación podría provocar que la presentación de antígenos por parte del sistema inmune sea inhibida debido a esta interrupción en el tráfico de proteínas del huésped (Cornell TC y cols., 2006; Zhou Z y cols., 2013). Sin embargo, el Rinovirus 16 humano produce una fragmentación del Golgi en células HeLa sin bloquear la secreción de proteínas (Mousnier A y cols., 2014).

En células Vero infectadas por VBUN, estos aparatos de Golgi fragmentados parecen mantener el transporte de proteínas y virus, que abandonan las células en vesículas de secreción. Simultáneamente, otra vía de salida y propagación de VBUN tiene lugar en células Vero. Se trata de estructuras vacuolares con muchos virus que pasan de célula a célula.

En este trabajo, se visualizó por primera vez en células Vero la presencia de estructuras membranosas globulares que contenían numerosas partículas virales en su interior. Hasta la fecha, se había descrito que las partículas virales intracelulares maduras (vim) son transportadas a la membrana plasmática en vesículas de secreción con pocas partículas virales en su interior. La video-microscopía de célula viva con el virus fluorescente rBUNGc-eGFP mostró que estas estructuras globulares se forman en el interior de la célula y no son expulsadas al medio extracelular, salvo cuando se produce la muerte de la célula. Se observó que células en las proximidades emiten prolongaciones citoplasmáticas e incorporan las estructuras vacuolares con virus que también son transmitidas de célula a célula. Finalmente, uno de los resultados importantes de la video-microscopía fue observar cómo las células que incorporan las estructuras globulares fluorescentes acaban desarrollando la infección y ensamblando factorías, lo que demuestra que estas estructuras contienen virus infectivos y representan un modo de propagación de VBUN no descrito con anterioridad.

Los resultados con el virus fluorescente rBUNGc-eGFP, que ensambla estructuras vacuolares de mayor tamaño que las detectadas con VBUN, sugieren que los virus con GFP en Gc podrían agregarse con más facilidad que los que no tienen la proteína fluorescente. El virus rBUNGc-eGFP fue generado mediante la sustitución de 346 residuos en el extremo Nt de Gc por la proteína fluorescente eGFP (Shi X y cols., 2011). Los dos residuos de cisteína que posee eGFP pueden formar oligómeros unidos mediante enlaces disulfuro, lo cual podría afectar a los oligómeros de Gc y Gn en la envuelta viral (Jain, RK y cols., 2001).

En cuanto al origen de las estructuras membranosas vacuolares con partículas virales en su interior, éstas podrían originarse en el *trans*-Golgi network (TGN) o por una modificación de las cisternas del Golgi, posiblemente mediante un agrandamiento de las cisternas del *trans*-Golgi. VBUN realiza su ensamblaje por gemación en el *cis*-Golgi y las partículas inmaduras son transportadas al *trans*-Golgi, donde la glicosilación de Gc y Gn desencadena la primera etapa de maduración de los virus, que pasan a ser completamente infectivos al salir al medio extracelular (Salanueva y cols., 2003; Novoa y cols., 2005a,b). En la literatura está descrito que el bunyavirus Oropouche, es capaz de modificar las cisternas del *trans*-Golgi formando estructuras vesiculares con partículas virales en su interior, que son liberadas de las cisternas de Golgi y que se encuentran separadas físicamente de las factorías virales. Para ello el virus

atrae el complejo endosomal requerido para el transporte (ESCRT) hacia el *trans*-Golgi donde, aparte de participar en la formación de la factoría viral, es necesario para el ensamblaje viral (Barbosa NS y cols., 2018).

El hecho de que muchas de estas estructuras membranosas contengan tanto virus maduros, inmaduros como restos membranosos, podría indicar la implicación de mecanismos celulares relacionados con inmunidad celular o con la autofagia. Otra situación que podría estar dándose, es una intermedia a la anterior, donde la estimulación de la autofagia fuera un mecanismo proviral y a su vez actuara en la supervivencia celular (Dupont N y cols., 2017; Echavarria- Consuegra L y cols., 2019). Algunos virus +ARNss son capaces de usar autofagosomas en su beneficio (Jackson y cols., 2005; Wileman, 2006; McLean JE y cols., 2011; Abernathy E y cols., 2019). Por lo tanto, estas estructuras que presentan una única membrana podrían ser autofagolisosomas, por lo que sería conveniente realizar un marcaje con anticuerpos específicos de fagosomas y lisosomas para detectar por ejemplo Lamp 1 o LC3. En la bibliografía está descrito que el virus SFTVS, perteneciente al orden bunyavirales, utiliza una estrategia por la cual es capaz de inducir la formación de vesículas en cuyo interior se han encontrado de 1 a 5 viriones, que posteriormente son secretadas al medio extracelular. Una vez secretadas al medio extracelular consiguen realizar una transmisión independiente del receptor del virus en las células hospedadoras. Estas vesículas parecen tener un origen endosomal, ya que colocalizan con el marcador temprano endosomal Rab-5 y el marcador de autofagia LC3 (Silvas JA y cols., 2015). Por lo tanto, sería necesario realizar más estudios para determinar el origen de las estructuras vacuolares con virus, aparte de los marcadores para autofagia sería también necesario descartar si estas estructuras vacuolares formadas por VBUN en células Vero pudieran tener un origen relacionado con la vía endosomal-lisosomal.

Uno de los aspectos más destacables de la infección de VBUN en células Vero, es la modificación sufrida por el núcleo en la infección. Pese a que los bunyanvirus realizan por completo su ciclo vital en el citoplasma celular (Novoa y cols., 2005a), el núcleo de las células Vero infectadas muestra unos cambios drásticos, incluyendo una desorganización total del nucléolo. NSs es la única proteína de bunyavirus que se ha localizado en el núcleo (Weber F y cols., 2001; Bridgen y cols., 2001; Thomas y cols., 2004). Esta proteína es el principal factor de virulencia de bunyavirus y bloquea el sistema inmune innato del hospedador inhibiendo la transcripción del ARNm celular por medio del bloqueo de la ARN polimerasa II celular (Léonard VH y cols., 2006A). Esto permite al virus evadir la respuesta del interferón (Bridgen y cols., 2001; Thomas y cols., 2004; Barry G y cols., 2014; Hong Y. y cols., 2019). Aparte del papel que

juega NSs en la inmunidad celular, se desconoce qué otras funciones podría estar desempeñando y con qué otros elementos celulares podría estar interaccionando. NSs es capaz de bloquear la polimerasa celular a concentraciones muy bajas (Weber F y cols., 2001), sumado a que su degradación por parte de los proteosomas es muy rápida, dio lugar a que inicialmente, sólo la detectáramos en un escaso número de células en ensayos de inmunofluorescencia.

Para conseguir señales más intensas se usó un inhibidor de proteosomas, en concreto MG-132. De este modo se consiguió un mayor acúmulo de NSs en la célula, lo que permitió obtener un marcaje claro de NSs en un mayor número de células. Además se encontró un marcaje tanto en el núcleo como en el citoplasma. Mediante el uso del software IMARIS, se consiguió generar un modelo tridimensional que nos ha permitido estudiar con detalle la distribución de NSs dentro del núcleo celular. Gracias a este modelo hemos podido observar que NSs se encuentra en acúmulos repartidos por todo el volumen nuclear. También se ha podido observar que la cromatina se encuentra en un estado de mayor condensación, dejando a la vista una estructura irregular con numerosas oquedades. NSs se encuentra en estas cavidades del núcleo, y no co-localiza con la cromatina. Mediante ME observamos cómo el nucléolo se desorganiza y fragmenta con la infección. Los cambios en el núcleo y nucléolo no se parecen a lo que ocurre en ninguna otra situación en la que núcleo y nucléolo puedan sufrir cambios, como ocurre en células Vero no infectadas que se encuentran en mitosis. Tampoco están presentes cuando infectamos células con el mutante rBUN-DeINSs que carece de NSs. En estas células el núcleo y el nucléolo no están alterados, señalando directamente a NSs como responsable de la desorganización del núcleo y nucléolo. Recientemente se ha descrito que la proteína NSs del virus Schmallenberg (SBV), perteneciente al género Orthobunyavirus, usa el nucléolo como blanco. Se encontró una señal de localización nucleolar (NoLS) en NSs de SBV que dirige a la proteína al nucléolo, donde colocaliza con proteínas nucleolares, como la fosfoproteína nucleolar B23 (Gouzil J y cols., 2017).

Gracias al estudio de criosecciones e inmunomarcaje con partículas de oro con el método de Tokuyasu, conseguimos detectar NSs en el núcleo, nucléolo y las mitocondrias. NSs podría estar implicada en formación de la factoría viral y la migración de las mitocondrias cerca de los ORs, ya que como se ha mostrado en las infecciones con rBUN-DeINSs, cuando NSs no está presente se produce una migración menor de las mitocondrias hacia la factoría. Además, la alteración morfológica de las mitocondrias observada en VBUN y no en rBUN-DeINSs podría estar siendo llevada a cabo entre otros factores, por NSs. Las mitocondrias son orgánulos

multifuncionales que son alterados por los virus de diferentes formas (Anand SK y Tikoo SK, 2013). Aparte de ser el orgánulo que pudiera estar suministrando energía durante la replicación viral, las mitocondrias podrían ser alteradas por VBUN para secuestrar proteínas mitocondriales o alterar el sistema inmune innato para su propio beneficio (Anand SK y Tikoo SK 2013; Khan M y cols., 2015; Reshi L y cols., 2018). En trabajos anteriores se observó que la proteína NSs de VBUN es capaz de disminuir parcialmente la apoptosis celular interfiriendo con el factor pro-apoptótico regulador del interferón 3 (IRF-3) (Kohl y cols., 2003). Por lo tanto, esta localización en la mitocondria sugiere que NSs podría estar llevando a cabo otras actividades para neutralizar rutas apoptóticas o procesos de inmunidad celular (Katze MG y cols., 2002; Anand SK y Tikoo SK, 2013).

Las interacciones de NSs en el núcleo están aún poco definidas. En el futuro será interesante avanzar en el conocimiento de la principal proteína implicada en la alteración de la inmunidad celular y la responsable de la virulencia del virus. Esta información es importante, ya que una mejor comprensión de estas interacciones, nos puede aportar un conocimiento mayor de los mecanismos que VBUN utiliza para llevar su ciclo vital de forma efectiva en el hospedador. El siguiente paso sería expresar tan sólo NSs y observar qué cambios estructurales es capaz de inducir en la célula por sí sola.

Una vez caracterizada la infección de VBUN en células Vero, el siguiente paso de este trabajo ha consistido en estudiar el efecto de los antivirales RBV y AgNPs en la infección de este virus.

2.- Efectos de RBV en células Vero infectadas con VBUN

Los virus pueden tener diferentes estrategias a la hora de infectar un huésped y los compuestos antivirales tener diferentes mecanismos de acción según la línea celular. Las factorías de replicación de VBUN tienen características diferentes según la línea celular, como hemos visto que ocurre en BHK-21, MRC-5 y Hep2 (Salanueva y cols., 2003; Novoa y cols., 2005a; Fontana y cols., 2008), C636 (López-Montero N y Risco C, 2011) y en células Vero (Salanueva y cols., 2003; García-Serradilla y Risco, *en preparación*). En cuanto a la RBV, debido a que su metabolismo intracelular varía según la línea celular, encontramos que es capaz de inhibir un mismo virus usando diferentes mecanismos de acción en líneas celulares distintas (Shah NR y cols., 2010; Mori K y cols., 2011; Beaucourt S y Vignuzzi M, 2014).

Por lo tanto, la RBV es capaz de actuar a diferentes niveles en la replicación viral, lo que le confiere unos mecanismos de acción complejos y escasamente conocidos. Basándonos en la bibliografía, que indica que la Ribavirina Trifosfato (RTP) es el metabolito activo en otros virus

del orden bunyavirales como HTNV (Cassidy LF y cols., 1989; Sun Y y cols., 2007; Safronetz D y cols., 2011) y teniendo en cuenta que el principal metabolito de RBV en células de mamífero es la RTP (Smee y Matthews, 1986; Zimmerman y Deepröse, 1978; Page y Connor, 1990; Smee y cols., 2002), es probable que el principal mecanismo de acción implicado en las células Vero infectadas por VBUN se deba a la RTP, que se uniría e inactivaría la polimerasa viral.

El rango de IC₅₀ en células Vero para diferentes virus es de 3,69-99.56 µg/mL (Huggins JW, 1989; Rusnak JM, 2011; Lee MJ y cols., 2017; Franco EJ y cols., 2018). Nuestros resultados han mostrado que a la concentración de 50 µg/mL, RBV inhibe significativamente en su totalidad la propagación y la infectividad de VBUN en las células Vero. En este trabajo se ha mostrado que la RBV no actúa a nivel de entrada ni adhesión del virus a la célula, y que tampoco actúa directamente contra las partículas virales cuando son incubadas con la droga. Como se ha descrito, al añadir RBV a tiempos tardíos de post-infección, cuando el virus ya ha realizado al menos un ciclo de replicación, el efecto inhibitor es mucho menor que cuando la célula dispone de la droga a 1 h.p.i. Por lo tanto, este dato nos indica que RBV está actuando en estadios iniciales del ciclo de replicación, probablemente durante la transcripción temprana y síntesis de ARNm (Parker WB, 2005; Graci y Cameron, 2006; Nystrom K y cols., 2019). En las células tratadas con RBV hemos observado que, cuando son estudiadas en detalle mediante ME, la mayoría no presentan ningún tipo de modificación estructural característica de una célula infectada, es decir, el virus no es capaz de usar la maquinaria celular para ensamblar la factoría viral.

Mediante MF encontramos que VBUN es capaz de replicarse en un porcentaje muy pequeño de células (~10%). Al estudiar estas células que presentaban signos de infección mediante ME, encontramos que se hallaban por lo general estructuralmente poco dañadas, con escasas alteraciones morfológicas. Gracias a la CLEM, se observó por primera vez que las esférulas que albergan los CRs en estas células con signos de infección se encontraban alteradas estructuralmente, deformes, con imperfecciones en la membrana periférica, ligeramente más hinchadas y con un interior menos denso a los electrones. Posteriormente cuando se hizo un amplio estudio mediante ME, encontramos que la mayoría de este 10% de células con signos de infección, presentaban las esférulas de los ORs alteradas. Esto nos estaría indicando que, en estas células, VBUN ha conseguido realizar la primera etapa del ciclo vital, sintetizando las proteínas virales necesarias para la formación de los ORs pero que lo ha hecho de forma anómala. Esta alteración en las estructuras de replicación, nos indica que RBV está también actuando a nivel de la integridad de los CRs. El contenido menos denso a los electrones

observado en el interior de las esférulas donde se encuentran los CRs, nos indica que posiblemente se esté sintetizando una menor cantidad de ARN viral por unión de RBV a L, la polimerasa de VBUN. Las alteraciones morfológicas de las esférulas apuntan también a un papel estructural de las moléculas de L en la construcción de las mismas.

Por otro lado, esta estructura aberrante de las esférulas podría deberse a una alteración de los lípidos implicados en la formación de los ORs. Estudios recientes han mostrado que RBV es capaz de suprimir genes lipogénicos y lípidos intracelulares neutros necesarios para la replicación viral (Younossi ZM y cols., 2016; Satoh S y cols., 2017; Satoh S y cols., 2019). Estudios de cómo VBUN modula el metabolismo lipídico en beneficio de su ciclo vital, proporcionarán nuevas ideas para tratamientos que interfieran con la síntesis y transporte de lípidos implicados en la infección por VBUN.

Pese a que en células Vero tratadas con RBV la mayoría de esférulas virales a las 10 h.p.i. encontradas estaban alteradas, era posible encontrar un escaso número de esférulas aparentemente normales. Esto podría ser debido a dos circunstancias, la primera, que debido a las condiciones de los experimentos y los tiempos post-infección usados, a 10 h.p.i. exista una menor cantidad de RBV en las células, que la metabolizan con el tiempo. La segunda, que estas esférulas hayan sido ensambladas por variantes de VBUN que habrían adquirido mutaciones convirtiéndose en virus resistentes a la RBV.

Pese a que la RBV es una molécula polar y se difunde poco a través de las membranas celulares, no se han encontrado diferencias en cuanto a la entrada de la RBV en diferentes líneas celulares de mamífero nucleadas (Shah NR y cols., 2010), pudiéndose incorporar sin problema gracias al transportador de nucleósidos de membrana plasmática 1 (ENT1) (Jarvis y cols., 1998; Yamamoto y cols., 2007). La acumulación de RBV dentro de las células depende del transportador ENT1, de las tasas de fosforilación intracelular y de la degradación de los metabolitos fosforilados. Esto conduce a concentraciones intracelulares variables de RBV activa y contribuye a su toxicidad y a la variabilidad de su eficacia entre diferentes líneas celulares (Endres y cols., 2009; Ibarra KD y Pfeiffer JK, 2009; Shah NR y cols., 2010). En las células nucleadas, RTP es defosforilada activamente por la fosfatasa alcalina y la 5-nucleotidasa, lo que provoca que la RTP sea exportada de nuevo al compartimento extracelular (Willis y cols., 1978; Page y Connor, 1990). La disposición de RTP en las células tiene un pico máximo a las 8 horas y empieza a decrecer a partir de las 12 horas (Smee DF y Matthews TR, 1986; Page T y Connor JD, 1990; Dixit NM y Perelson AS, 2005; Sun Y y cols., 2006).

Un mayor acúmulo de las formas fosforiladas de RBV a largo plazo se correlaciona con una mayor eficacia; por el contrario en aquellas células donde se produce un menor acúmulo debido a su metabolismo celular, se muestra una menor eficacia y la aparición por lo tanto de una resistencia natural a la droga (Ibarra KD y Pfeiffer JK, 2009; Shah NR y cols., 2010). Dentro de esta variabilidad del catabolismo de RBV, las células Vero son las que han mostrado mayor resistencia a la RBV (Shah NR y cols., 2010).

Por lo tanto, la ineficacia de un fármaco en una línea celular podría estar mostrando una resistencia natural de la célula a la droga y no un mecanismo de evasión del virus. Por ellos es importante estudiar otras líneas celulares cuando se ha obtenido una baja inhibición del virus en un modelo celular concreto.

Nuestros experimentos sugieren que la escasa replicación viral encontrada a las 10 h.p.i. y su posterior incremento a tiempos más tardíos de post-infección podría ser debida a la menor acumulación de RTP en las células Vero. Esta resistencia celular a la RBV hace que el aporte extra de RBV realizado a las 10 h.p.i. en células que posteriormente fueron fijadas a 24 h.p.i. no sirviera para obtener una neutralización del virus similar a la observada a las 10 h.p.i.

Aparte de la resistencia de las células Vero a la RBV a partir de las 10 h.p.i. podría estar dándose otra situación, la posible formación de variantes de VBUN debido a mutaciones adquiridas que le estuvieran otorgando al virus la capacidad de multiplicarse en presencia de RBV.

Para estudiar esta posibilidad se realizó un estudio para valorar si los virus producidos en estas células tratadas con RBV resultaban igualmente infectivos que los producidos en células no tratadas. Para ello se seleccionaron aquellos virus capaces de crecer en presencia de RBV y que por tanto eran resistentes a la droga. Este estudio mostró, que los virus que habían sido capaces de replicarse en presencia de RBV, resultaban ser notablemente menos infectivos. También producían un efecto citopático menor que el virus *wt*, no observándose grandes cambios estructurales en la célula.

Cuando las células eran infectadas a 1UFP/célula, el patrón de fluorescencia era cercano a la normalidad, no se detectaba acumulación de proteína viral y las estructuras celulares, como el Golgi o el núcleo no mostraban alteraciones. Se decidió aumentar el número de virus en el inóculo viral, lo cual resultó en un gran incremento de la cantidad de proteína viral, pero con la presencia un patrón distinto. Este presentaba una señal dispersa de Gc por toda la célula, a veces formando pequeños acúmulos de señal, la cual, no localizaba cerca del Golgi. En este patrón, el Golgi presentaba una apariencia normal, agrupado sin disgregar, el núcleo

presentaba una cromatina homogénea y el nucléolo era visible. Estos resultados se correlacionan bien con los estudios de ultraestructura mediante ME en los que se observó que en estas células la mayoría de ORs se situaban lejos del Golgi, pero no se pudo esclarecer en qué orgánulo. Considerando la localización de la factoría con respecto al Golgi, este orgánulo podría ser el TGN. Estudios futuros con marcadores de compartimentos celulares permitirán aclarar esta posibilidad.

Que los virus que resisten la RBV sean capaces de utilizar un orgánulo diferente al aparato de Golgi para ensamblar su factoría de replicación es un dato importante ya que, estaría mostrando cómo el virus es capaz de adaptarse al tratamiento con RBV. Esto permite especular que mutaciones en las proteínas virales como consecuencia del tratamiento con RBV producirían interacciones con distintos factores celulares que permitirían el ensamblaje de los ORs en otros orgánulos diferentes al Golgi.

Los virus ARN producen una gran cantidad de variantes fenotípicas que pueden evolucionar rápidamente como respuesta a condiciones ambientales cambiantes, como la presencia de una droga antiviral (Agudo R y cols., 2016; De la Higuera y cols., 2017; Domingo E, 2019). Sin embargo, es posible que no siempre puedan generarse fenotipos resistentes, y el virus llegue a una situación de catástrofe, debido a que el número de mutaciones producidas en el genoma es demasiado grande para la viabilidad (Domingo E y cols., 1985; Domingo E, 2002; Holmes y Moya, 2002; Domingo E y Perales C, 2018; Borrego B y cols., 2019).

En este estudio se ha mostrado que la RBV no era capaz de eliminar el VBUN por completo. Se realizaron tan sólo otros tres pases celulares seriados en presencia de RBV, usando los virus procedentes del pase anterior y se obtuvieron resultados similares a lo descrito con los virus procedentes del primer pase. Sería interesante realizar más pases seriados en presencia de RBV, para averiguar si se produce la extinción del virus, pero esta situación posiblemente no se produzca debido a que un mayor número de pases aumentaría el *fitness* viral, término que hace referencia a la capacidad replicativa del virus, la cual le permitiría producir una progenie infecciosa estable en presencia de RBV y posiblemente la aparición de múltiples resistencias. Esta situación permitiría a VBUN incorporar nuevas mutaciones que resulten beneficiosas, confiriendo a VBUN una mayor capacidad de replicación en presencia de RBV. De ser así, la caracterización de las mutaciones adquiridas mediante secuenciación de los virus mutados, sería de gran utilidad ya que permitiría desarrollar nuevas variantes del fármaco, las cuales podrían atacar aquellas regiones del virus que le habían conferido resistencia.

Los datos obtenidos se resumen en la Figura D1 en la que se indican los principales efectos de RBV en células infectadas con VBUN.

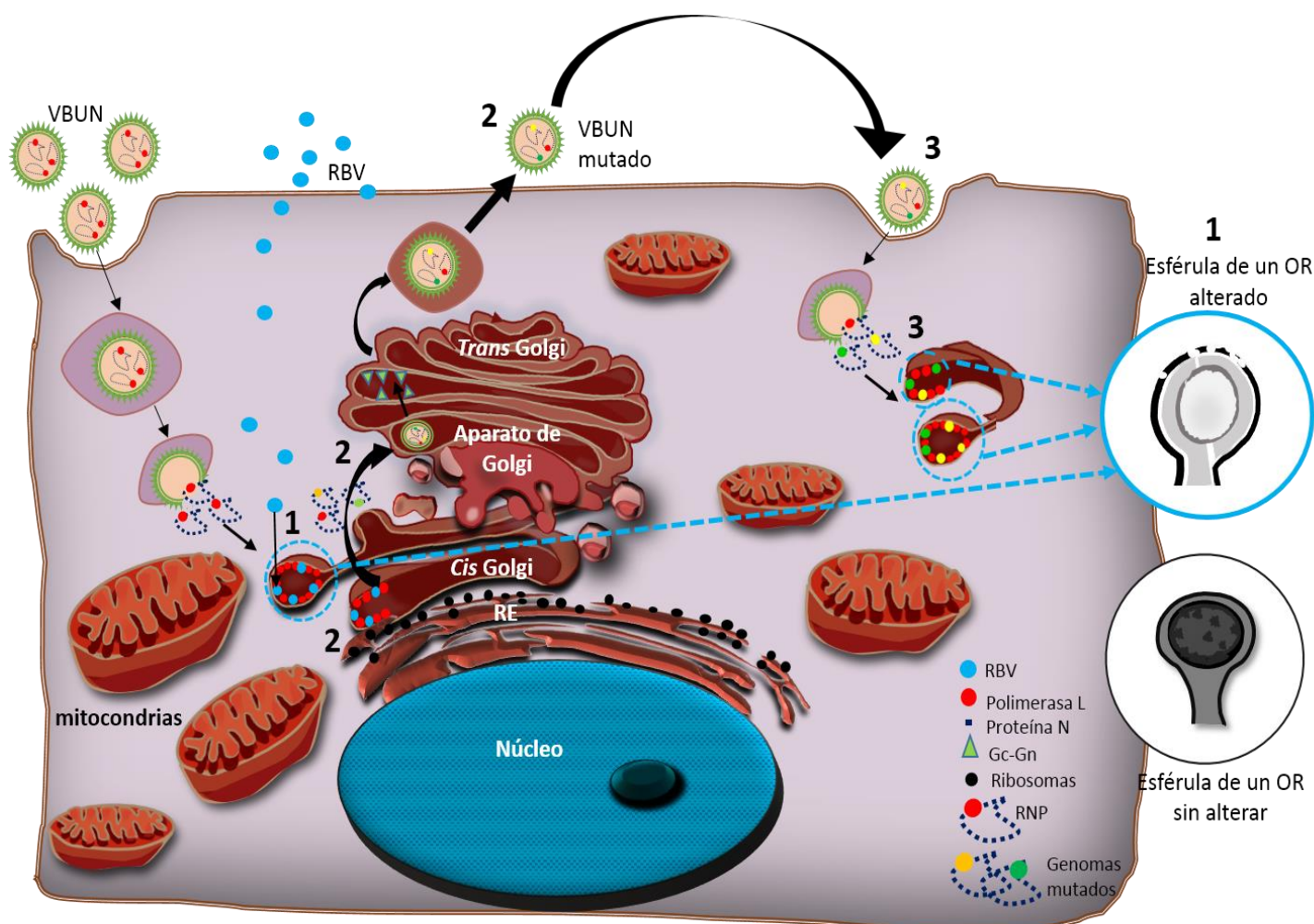


Figura D1. Mecanismos de acción de RBV en células Vero infectadas con VBUN.

- Mecanismo 1: RBV induce la alteración de la estructura de las esférulas de los OR.
- Mecanismo 2: RBV induce mutaciones en VBUN que dan lugar a variantes menos citopáticas del virus.
- Mecanismo 3: Los virus mutados son capaces de utilizar un orgánulo diferente al aparato de Golgi para ensamblar su factoría de replicación. Las esférulas de los OR ensambladas por estos virus se encuentran alteradas.

3.- Efectos de las AgNPs en células Vero infectadas con VBUN.

Pese a que las AgNPs han mostrado capacidad antiviral (Baram-Pinto y cols., 2009; Xiang y cols., 2013; Borrego B y cols., 2016), los diferentes mecanismos de acción antiviral implicados aún no están bien definidos. Las AgNPs podrían estar actuando a nivel de entrada, o directamente induciendo cambios sobre la partícula viral volviéndola no infectiva (Elechiguerra y cols., 2005; Xiang y cols., 2013). Para valorar esta opción, inicialmente incubamos las AgNPs con VBUN y mediante tinción negativa comprobamos que las partículas eran capaces de unirse a la superficie de los virus. Posteriormente se realizó una batería de estudios a diferentes tiempos de tratamiento y concentraciones de AgNPs que revelaron una buena inhibición de la infección de VBUN desde las dosis más bajas. La mayor inhibición fue obtenida en las células que habían sido pre-tratadas con AgNPs antes de añadir el virus, lo que podría estar indicando que las AgNPs actuarían a nivel de entrada de las partículas virales. El efecto inhibitorio observado en las células que habían sido tratadas una hora después de añadir el virus nos indica que las AgNPs también están actuando en una etapa post-entrada.

Los estudios de ME mostraron que las células tratadas con AgNPs a 1 h.p.i. mantenían una estructura cercana a la normalidad, no observándose apenas células con signos de infección a las 10 h.p.i. Con los agentes de tinción que se emplean en ME de secciones ultrafinas, resultó imposible detectar las AgNPs en el interior celular. Mediante incubación con sales de plata se intentó aumentar el diámetro de las AgNPs para poder detectarlas después de la tinción, pero los resultados no fueron óptimos ya que se formaban precipitados inespecíficos. Por lo tanto la estrategia que se siguió para poder estudiar su localización dentro de la célula fue estudiar las secciones ultrafinas sin agentes de tinción. Cuando se estudiaron estas secciones y pese a que no se obtiene el mismo detalle que en secciones teñidas, se detectaron de forma clara las AgNPs y las diferentes estructuras celulares. A tiempos cortos de post-tratamiento con las AgNPs, éstas localizaban en el núcleo, mitocondrias y en las factorías virales donde se encontraban los ORs, donde también aparecían aparentemente unidas a los ORs. En la mayoría de células con signos de infección y que se habían tratado con AgNPs se encontraba un mayor número de ORs agrupados. Esto puede ser debido a que cómo mostraban los estudios de MF y ME, el Golgi no se fragmenta ni se dispersa, lo que podría estar concentrando los ORs en los Golgi intactos.

Cuando se estudiaron los ORs mediante ME, se observó que estos resultaban significativamente alterados. Las esférulas que albergan los CRs se encontraban deformadas, con un contenido menos denso a los electrones y de apariencia vacía. Esto estaría indicando,

que no se está sintetizando o acumulando material genético viral en su interior. Es la primera vez que se muestra que las AgNPs son capaces de alterar las esférulas que albergan los CRs.

Cuando en estos tiempos cortos de tratamiento se estudiaron los virus extracelulares, se observó que las partículas de plata estaban unidas a su superficie. Estos virus extracelulares se encontraban alterados estructuralmente, algunos de ellos prácticamente destruidos. Esto nos indica que las AgNPs estarían actuando directamente contra la partícula viral, dificultando así su entrada en la célula.

Las AgNPs se encontraron también en el núcleo y en mitocondrias. La interacción con mitocondrias podría estar desencadenando la activación de mecanismos de defensa celular, como el incremento de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) o estrés nitrosativo (RNS) (Barcinska y cols., 2018); también podrían estar activando rutas para inducir apoptosis. (Bing Zhu y cols., 2016). Las AgNPs en el núcleo podrían estar liberando iones de plata Ag^+ , que reaccionarían con proteínas nucleares y ácidos nucleicos causando daños en el ADN y en los cromosomas celulares (Zhang T y cols., 2014).

Cuando las células se incubaron con las AgNPs a tiempos largos, se observó que las partículas de plata se acumulaban exclusivamente en estructuras membranosas que podrían corresponder a lisosomas (Anda R Gliga y cols., 2014; Zhang T y cols., 2014). Esta respuesta posiblemente sea debida a un mecanismo de defensa celular, ya que esta acumulación en estructuras vacuolares, fue observada tanto en células Vero no infectadas como en las infectadas. Aunque en la bibliografía está descrito que con dosis de 6 a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de AgNPs no se observan daños celulares en estudios de viabilidad (Dongxi Xiang y cols., 2013) en nuestro modelo de estudio hemos observado que a tiempos más largos de post-infección y con dosis $>6 \mu\text{g}/\text{ml}$, las mitocondrias presentaban alteraciones morfológicas importantes. Tanto las AgNPs como los iones Ag^+ liberados pueden producir un estrés oxidativo generalizado en la membrana celular y en diferentes orgánulos, como en mitocondrias, núcleo o lisosomas, llevando a la célula a situaciones de apoptosis o necrosis (Zhang T y cols., 2014; Gliga AR y cols., 2014). Los nuevos métodos de “síntesis verde” de las AgNPs, donde se usan biomoléculas en vez de agentes reductores y estabilizadores comerciales, han mitigado sus efectos tóxicos, pero en las aplicaciones clínicas no sólo se requiere el desarrollo de soluciones seguras y ecológicas, se necesita una mayor comprensión de los mecanismos de acción de las AgNPs. Como paso previo a los estudios en un modelo *in vivo* donde se puedan estudiar los efectos biológicos causados por las AgNPs y su efectividad como antiviral, se muestra muy importante conocer los efectos de las AgNPs en diferentes modelos celulares.

Los datos obtenidos se recopilan en la Figura D2 en la que se indican los principales efectos de las AgNPs en células infectadas con VBUN.

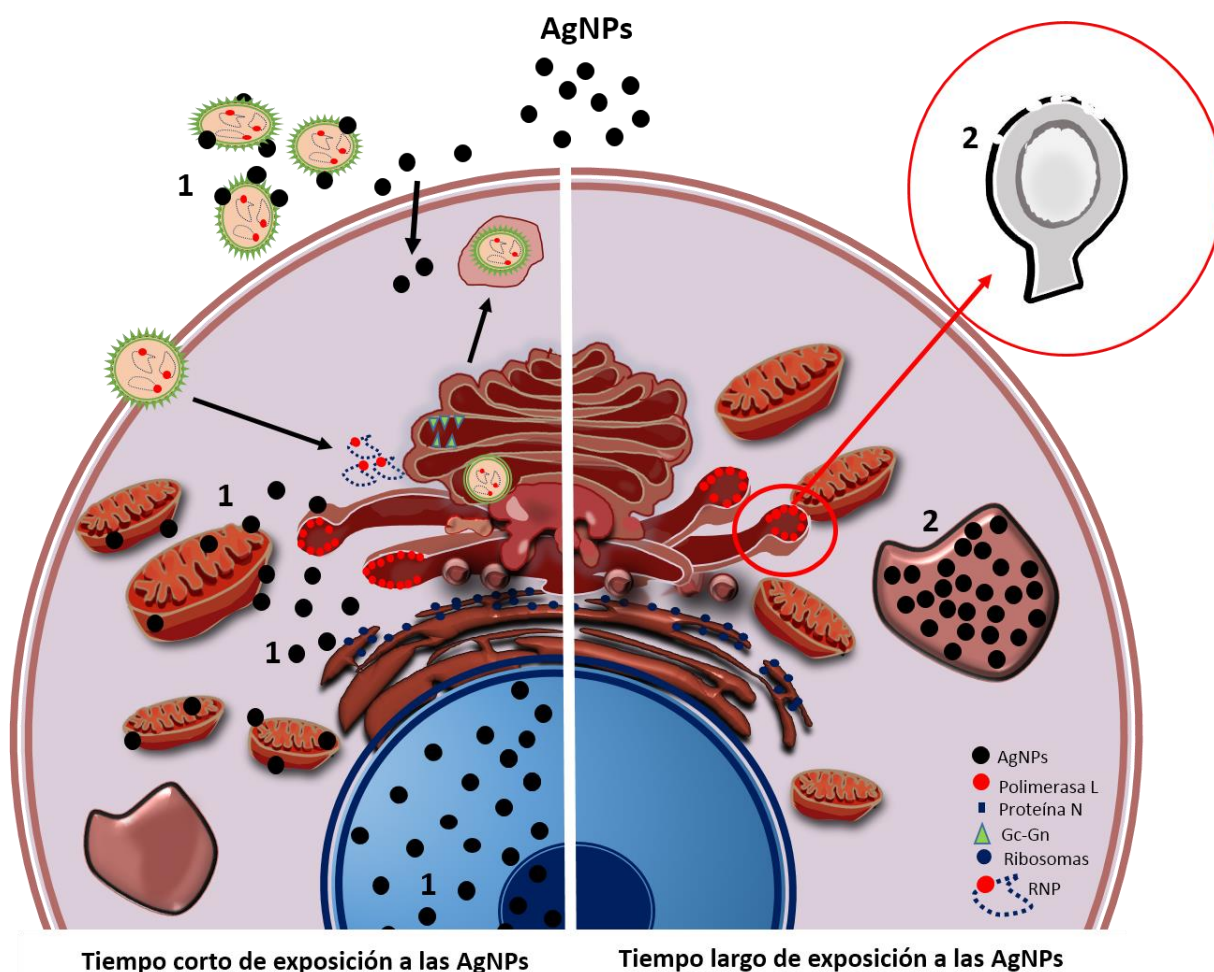


Figura D2. Efectos de las AgNPs en células Vero infectadas con VBUN.

Células Vero infectadas con VBUN a 1 UFP/célula y fijadas a 10 h.p.i. (1) AgNPs añadidas 30 min antes de fijar. (2) AgNPs añadidas a la hora de post-intección.

(1) A un tiempo corto de incubación, las AgNPs se unen a las partículas virales en el medio extracelular, y posteriormente se localizan en el núcleo, nucléolo, mitocondrias, en las factorías virales y unidas a los ORs.

(2) A tiempo largo de incubación las AgNPs se acumulan en estructuras membranosas, las esférulas de los ORs se encuentran alteradas estructuralmente y se observa una menor producción de partículas virales que en células no tratadas o tratadas a tiempos largos de post-infección.

En resumen, en esta tesis se ha demostrado que RBV es capaz de inhibir de forma eficaz la infección de VBUN. También se ha descubierto la generación de virus resistentes a RBV que ensamblan su factoría de replicación en un orgánulo diferente al que utiliza el virus parental. Las AgNPs pese a haber mostrado una gran eficacia contra VBUN, provocan efectos tóxicos a nivel celular, los cuales, siguen estando poco caracterizados. Una vez conocidos y mitigados los efectos tóxicos de las AgNPs, podría emplearse una terapia combinada con RBV y AgNPs. Ésta podría evitar la aparición de virus resistentes y producir un menor daño celular al poder utilizarse dosis más bajas de ambos compuestos.

En esta tesis también se ha mostrado que la combinación de técnicas de imagen aporta una mayor comprensión de los mecanismos de acción de los compuestos antivirales, las resistencias generadas y la toxicidad a nivel celular. La resolución que aportan estas técnicas permite tener un conocimiento a nivel de célula única, orgánulo celular y complejos macromoleculares de interés. Técnicas como la CLEM que permiten estudiar eventos únicos y aislados a nivel celular, están convirtiéndose en una potente herramienta en el campo de la virología y el desarrollo de estrategias antivirales.

Conclusiones

- 1) Las factorías de replicación de VBUN en células Vero están formadas por unidades del aparato de Golgi, que se fragmenta y dispersa, mitocondrias y cisternas del retículo endoplásmico. Durante la infección se produce también una descondensación de la cromatina nuclear, así como la desorganización y dispersión del nucléolo, siendo estos cambios marcadores de la infección de VBUN en células Vero.
- 2) La proteína no estructural NSs es la responsable de la desestructuración del nucléolo. Al infectar con un VBUN que carece de NSs, las factorías virales presentan un menor número de virus y de mitocondrias, lo cual apunta a un papel de NSs en la formación y funciones de la factoría de VBUN.
- 3) En células Vero, VBUN emplea un mecanismo de propagación no descrito con anterioridad consistente en la formación de estructuras vacuolares de gran tamaño con viriones infectivos en su interior que se transmiten de célula a célula.
- 4) La Ribavirina inhibe el crecimiento de VBUN en células Vero en más de un 90%. Este fármaco altera la integridad de las esférulas de los orgánulos de replicación viral, en las que se ensamblan los complejos replicativos. Este resultado sugiere que la ARN polimerasa viral podría además de replicar el genoma del virus, desempeñar un papel estructural en la construcción de los complejos replicativos.
- 5) Los virus que son capaces de crecer en presencia de la Ribavirina construyen su factoría en un orgánulo diferente al aparato de Golgi, lo cual apunta a la aparición de mutaciones en VBUN que generan interacciones con factores celulares nuevos.
- 6) Las Nano-partículas de plata inhiben el crecimiento de VBUN en células Vero en más de un 90%. Se unen a los orgánulos de replicación y a las partículas virales fuera de la célula, alterando visiblemente su integridad. Las Nano-partículas de plata también se unen y alteran la estructura de las mitocondrias, orgánulos fundamentales en la construcción de la factoría viral.

Bibliografía

1. **Abernathy, E., R. Mateo, K. Majzoub, N. van Buuren, S. W. Bird, J. E. Carette and K. Kirkegaard** (2019). "Differential and convergent utilization of autophagy components by positive-strand RNA viruses." *PLoS Biol* 17(1): e2006926.
2. **Agudo, R., I. de la Higuera, A. Arias, A. Grande-Perez and E. Domingo** (2016). "Involvement of a joker mutation in a polymerase-independent lethal mutagenesis escape mechanism." *Virology* 494: 257-266.
3. **Aitken, T. H., R. B. Tesh, B. J. Beaty and L. Rosen** (1979). "Transovarial transmission of yellow fever virus by mosquitoes (*Aedes aegypti*)." *Am J Trop Med Hyg* 28(1): 119-121.
4. **Akbarzadeh, A., L. Kafshdooz, Z. Razban, A. Dastranj Tbrizi, S. Rasoulpour, R. Khalilov, T. Kavetsky, S. Saghfi, A. N. Nasibova, S. Kaamyabi and T. Kafshdooz** (2018). "An overview application of silver nanoparticles in inhibition of herpes simplex virus." *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 46(2): 263-267.
5. **Akter, M., M. T. Sikder, M. M. Rahman, A. Ullah, K. F. B. Hossain, S. Banik, T. Hosokawa, T. Saito and M. Kurasaki** (2018). "A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives." *J Adv Res* 9: 1-16.
6. **Albornoz, A., A. B. Hoffmann, P. Y. Lozach and N. D. Tischler** (2016). "Early Bunyavirus-Host Cell Interactions." *Viruses* 8(5).
7. **Anand, S. K. and S. K. Tikoo** (2013). "Viruses as modulators of mitochondrial functions." *Adv Virol*: 738794.
8. **Andrei, G. and E. De Clercq** (1993). "Molecular approaches for the treatment of hemorrhagic fever virus infections." *Antiviral Res* 22(1): 45-75.
9. **Aranda, C., R. Eritja and D. Roiz** (2006). "First record and establishment of the mosquito *Aedes albopictus* in Spain." *Med Vet Entomol* 20(1): 150-152.
10. **AshaRani, P. V., G. Low Kah Mun, M. P. Hande and S. Valiyaveetil** (2009). "Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells." *ACS Nano* 3(2): 279-290.
11. **Bagga, S. and M. J. Bouchard** (2014). "Cell cycle regulation during viral infection." *Methods Mol Biol* 1170: 165-227.
12. **Baram-Pinto, D., S. Shukla, N. Perkash, A. Gedanken and R. Sarid** (2009). "Inhibition of herpes simplex virus type 1 infection by silver nanoparticles capped with mercaptoethane sulfonate." *Bioconjug Chem* 20(8): 1497-1502.
13. **Barbosa, N. S., L. R. Mendonca, M. V. S. Dias, M. C. Pontelli, E. Z. M. da Silva, M. F. Criado, M. E. da Silva-Januario, M. Schindler, M. C. Jamur, C. Oliver, E. Arruda and L. L. P. daSilva** (2018). "ESCRT machinery components are required for Orthobunyavirus particle production in Golgi compartments." *PLoS Pathog* 14(5): e1007047.
14. **Barcinska, E., J. Wierzbicka, A. Zauszkiewicz-Pawlak, D. Jacewicz, A. Dabrowska and I. Inkielewicz-Stepniak** (2018). "Role of Oxidative and Nitro-Oxidative Damage in Silver Nanoparticles Cytotoxic Effect against Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cells." *Oxid Med Cell Longev* 2018: 8251961.
15. **Barillo, D. J. and D. E. Marx** (2014). "Silver in medicine: a brief history BC 335 to present." *Burns* 40 Suppl 1: S3-8.
16. **Barnwal, B., H. Karlberg, A. Mirazimi and Y. J. Tan** (2016). "The Non-structural Protein of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Disrupts the Mitochondrial Membrane Potential and Induces Apoptosis." *J Biol Chem* 291(2): 582-592.
17. **Barrado-Gil, L., I. Galindo, D. Martinez-Alonso, S. Viedma and C. Alonso** (2017). "The ubiquitin-proteasome system is required for African swine fever replication." *PLoS One* 12(12): e0189741.
18. **Barre-Sinoussi, F., A. L. Ross and J. F. Delfraissy** (2013). "Past, present and future: 30 years of HIV research." *Nat Rev Microbiol* 11(12): 877-883.

19. **Barry, G., M. Varela, M. Ratnier, A. L. Blomstrom, M. Caporale, F. Seehusen, K. Hahn, E. Schnettler, W. Baumgartner, A. Kohl and M. Palmarini** (2014). "NSs protein of Schmallenberg virus counteracts the antiviral response of the cell by inhibiting its transcriptional machinery." *J Gen Virol* 95(Pt 8): 1640-1646.
20. **Beatty, B. J. and D. H. Bishop** (1988). "Bunyavirus-vector interactions." *Virus Res* 10(4): 289-301.
21. **Beaucourt, S. and M. Vignuzzi** (2014). "Ribavirin: a drug active against many viruses with multiple effects on virus replication and propagation. Molecular basis of ribavirin resistance." *Curr Opin Virol* 8: 10-15.
22. **Bekerman, E. and S. Einav** (2015). "Response-Applying antibiotics lessons to antivirals." *Science* 348(6242): 1437.
23. **Bekerman, E., G. Neveu, A. Shulla, J. Brannan, S. Y. Pu, S. Wang, F. Xiao, R. Barouch-Bentov, R. R. Bakken, R. Mateo, J. Govero, C. M. Nagamine, M. S. Diamond, S. De Jonghe, P. Herdewijn, J. M. Dye, G. Randall and S. Einav** (2017). "Anticancer kinase inhibitors impair intracellular viral trafficking and exert broad-spectrum antiviral effects." *J Clin Invest* 127(4): 1338-1352.
24. **Berger, C., I. Romero-Brey, D. Radujkovic, R. Terreux, M. Zayas, D. Paul, C. Harak, S. Hoppe, M. Gao, F. Penin, V. Lohmann and R. Bartenschlager** (2014). "Daclatasvir-like inhibitors of NS5A block early biogenesis of hepatitis C virus-induced membranous replication factories, independent of RNA replication." *Gastroenterology* 147(5): 1094-1105 e1025.
25. **Blair, C. D., Z. N. Adelman, and K. E. Olson** (2000). Molecular strategies for interrupting arthropod-borne virus transmission by mosquitoes. *Clin Microbiol Rev* 13, 651–661.
26. **Borrego, B., A. I. de Avila, E. Domingo and A. Brun** (2019). "Lethal Mutagenesis of Rift Valley Fever Virus Induced by Favipiravir." *Antimicrob Agents Chemother* 63(8).
27. **Borrego, B., G. Lorenzo, J. D. Mota-Morales, H. Almanza-Reyes, F. Mateos, E. Lopez-Gil, N. de la Losa, V. A. Burmistrov, A. N. Pestryakov, A. Brun and N. Bogdanchikova** (2016). "Potential application of silver nanoparticles to control the infectivity of Rift Valley fever virus in vitro and in vivo." *Nanomedicine* 12(5): 1185-1192.
28. **Boulon, S., B. J. Westman, S. Hutten, F. M. Boisvert and A. I. Lamond** (2010). "The nucleolus under stress." *Mol Cell* 40(2): 216-227.
29. **Bravo-Barriga, D., A. P. Gouveia Almeida, R. Parreira, D. Jimenez-Vidal, J. E. Perez-Martin, M. Martin-Cuervo and E. Frontera** (2019). "[First detections of *Aedes albopictus* (tiger mosquito) in the region of Extremadura, west of Spain]." *Gac Sanit* 33(3): 299-300.
30. **Breakwell, L., P. Dosenovic, G. B. Karlsson Hedestam, M. D'Amato, P. Liljestrom, J. Fazakerley and G. M. McInerney** (2007). "Semliki Forest virus nonstructural protein 2 is involved in suppression of the type I interferon response." *J Virol* 81(16): 8677-8684.
31. **Bridgen, A., F. Weber, J. K. Fazakerley, and R. M. Elliott** (2001). "Bunyamwera bunyavirus nonstructural protein NSs is a nonessential gene product that contributes to viral pathogenesis". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:664– 669.
32. **Burdusel, A. C., O. Gherasim, A. M. Grumezescu, L. Mogoanta, A. Ficai and E. Andronescu** (2018). "Biomedical Applications of Silver Nanoparticles: An Up-to-Date Overview." *Nanomaterials* (Basel) 8(9).
33. **Burt, F. J., M. S. Rolph, N. E. Rulli, S. Mahalingam and M. T. Heise** (2012). "Chikungunya: a re-emerging virus." *Lancet* 379(9816): 662-671.
34. **Bykov, Y. S., M. Cortese, J. A. Briggs and R. Bartenschlager** (2016). "Correlative light and electron microscopy methods for the study of virus-cell interactions." *FEBS Lett* 590(13): 1877-1895.

35. **Cameron, C. E. and C. Castro** (2001). "The mechanism of action of ribavirin: lethal mutagenesis of RNA virus genomes mediated by the viral RNA-dependent RNA polymerase." *Curr Opin Infect Dis* 14(6): 757-764.
36. **Caplan, J., M. Niethammer, R. M. Taylor, 2nd and K. J. Czymmek** (2011). "The power of correlative microscopy: multi-modal, multi-scale, multi-dimensional." *Curr Opin Struct Biol* 21(5): 686-693.
37. **Carlson, C. J., E. R. Dougherty and W. Getz** (2016). "An Ecological Assessment of the Pandemic Threat of Zika Virus." *PLoS Negl Trop Dis* 10(8): e0004968.
38. **Carlson, C., S. M. Hussain, A. M. Schrand, L. K. Braydich-Stolle, K. L. Hess, R. L. Jones and J. J. Schlager** (2008). "Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species." *J Phys Chem B* 112(43): 13608-13619.
39. **Cassidy, L. F. and J. L. Patterson** (1989). "Mechanism of La Crosse virus inhibition by ribavirin." *Antimicrob Agents Chemother* 33(11): 2009-2011.
40. **Charlton, F. W., S. Hover, J. Fuller, R. Hewson, J. Fontana, J. N. Barr and J. Mankouri** (2019). "Cellular cholesterol abundance regulates potassium accumulation within endosomes and is an important determinant in bunyavirus entry." *J Biol Chem* 294(18): 7335-7347.
41. **Chen, N., Y. Zheng, J. Yin, X. Li and C. Zheng** (2013). "Inhibitory effects of silver nanoparticles against adenovirus type 3 in vitro." *J Virol Methods* 193(2): 470-477.
42. **Chowdhury, S., A. Basu and S. Kundu** (2014). "Green synthesis of protein capped silver nanoparticles from phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid with antimicrobial properties against multidrug-resistant bacteria." *Nanoscale Res Lett* 9(1): 365.
43. **Cifuentes-Munoz, N., N. Salazar-Quiroz and N. D. Tischler** (2014). "Hantavirus Gn and Gc envelope glycoproteins: key structural units for virus cell entry and virus assembly." *Viruses* 6(4): 1801-1822.
44. **Cleton, N., M. Koopmans, J. Reimerink, G. J. Godeke and C. Reusken** (2012). "Come fly with me: review of clinically important arboviruses for global travelers." *J Clin Virol* 55(3): 191-203.
45. **Colon-Ramos, D. A., P. M. Irusta, E. C. Gan, M. R. Olson, J. Song, R. I. Morimoto, R. M. Elliott, M. Lombard, R. Hollingsworth, J. M. Hardwick, G. K. Smith and S. Kornbluth** (2003). "Inhibition of translation and induction of apoptosis by Bunyaviral nonstructural proteins bearing sequence similarity to reaper." *Mol Biol Cell* 14(10): 4162-4172.
46. **Conway M.J., A.M. Watson, T.M. Colpitts, S.M. Dragovic, L. Zhiyong, P. Wang, et al** (2014). "Mosquito saliva serine protease enhances dissemination of dengue virus into the mammalian host." *J. Virol* 88, pp. 164-175
47. **Cornell, C. T., W. B. Kiosses, S. Harkins and J. L. Whitton** (2006). "Inhibition of protein trafficking by coxsackievirus b3: multiple viral proteins target a single organelle." *J Virol* 80(13): 6637-6647.
48. **Crotty, S., C. Cameron and R. Andino** (2002). "Ribavirin's antiviral mechanism of action: lethal mutagenesis?" *J Mol Med (Berl)* 80(2): 86-95.
49. **Crotty, S., D. Maag, J.J. Arnold, W. Zhong, J.Y. Lau, Z. Hong, R. Andino, C.E. Cameron** (2001). "The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen". *Nature medicine*. 6. 1375-9. 10.1038/82191.
50. **Cummings, K. J., S. M. Lee, E. S. West, J. Cid-Ruzafa, S. G. Fein, Y. Aoki, M. S. Sulkowski and S. N. Goodman** (2001). "Interferon and ribavirin vs interferon alone in the re-treatment of chronic hepatitis C previously nonresponsive to interferon: A meta-analysis of randomized trials." *JAMA* 285(2): 193-199.

-
51. **de Boer, P., J. P. Hoogenboom and B. N. Giepmans** (2015). "Correlated light and electron microscopy: ultrastructure lights up!" *Nat Methods* 12(6): 503-513.
 52. **de Castro Martin, I. F., G. Fournier, M. Sachse, J. Pizarro-Cerda, C. Risco and N. Naffakh** (2017). "Influenza virus genome reaches the plasma membrane via a modified endoplasmic reticulum and Rab11-dependent vesicles." *Nat Commun* 8(1): 1396.
 53. **De Clercq E.** (2004). "Antiviral drugs in current clinical use." *J Clin Virol.* 30(2):115-33.
 54. **De Clercq, E.** (2004). "Antivirals and antiviral strategies." *Nat Rev Microbiol* 2(9): 704-720.
 55. **De Clercq, E. and G. Li** (2016). "Approved Antiviral Drugs over the Past 50 Years." *Clin Microbiol Rev* 29(3): 695-747.
 56. **de la Higuera, I., C. Ferrer-Orta, A. I. de Avila, C. Perales, M. Sierra, K. Singh, S. G. Sarafianos, Y. Dehouck, U. Bastolla, N. Verdaguer and E. Domingo** (2017). "Molecular and Functional Bases of Selection against a Mutation Bias in an RNA Virus." *Genome Biol Evol* 9(5): 1212-1228.
 57. **Di Bisceglie, A. M., J. Thompson, N. Smith-Wilkaitis, E. M. Brunt and B. R. Bacon** (2001). "Combination of interferon and ribavirin in chronic hepatitis C: re-treatment of nonresponders to interferon." *Hepatology* 33(3): 704-707.
 58. **DiMasi, J. A., H. G. Grabowski and R. W. Hansen** (2016). "Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs." *J Health Econ* 47: 20-33.
 59. **Ding, W. X., H. M. Ni, W. Gao, T. Yoshimori, D. B. Stolz, D. Ron and X. M. Yin** (2007). "Linking of autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability." *Am J Pathol* 171(2): 513-524.
 60. **Ding, W. X., H. M. Ni, X. Chen, J. Yu, L. Zhang and X. M. Yin** (2007). "A coordinated action of Bax, PUMA, and p53 promotes MG132-induced mitochondria activation and apoptosis in colon cancer cells." *Mol Cancer Ther* 6(3): 1062-1069.
 61. **Dixit, N. M. and A. S. Perelson** (2006). "The metabolism, pharmacokinetics and mechanisms of antiviral activity of ribavirin against hepatitis C virus." *Cell Mol Life Sci* 63(7-8): 832-842.
 62. **Domingo, E.** (2002). Quasispecies theory in virology. *J. Virol.*, 76:463–465.
 63. **Domingo, E. and C. Perales** (2018). "Quasispecies and virus." *Eur Biophys J* 47(4): 443-457.
 64. **Domingo, E., A. I. de Avila, I. Gallego, J. Sheldon and C. Perales** (2019). "Viral fitness: history and relevance for viral pathogenesis and antiviral interventions." *Pathog Dis* 77(2).
 65. **Domingo, E., E. Martinez-Salas, F. Sobrino, J. C. de la Torre, A. Portela, J. Ortin, C. Lopez-Galindez, P. Perez-Brena, N. Villanueva, R. Najera and et al.** (1985). "The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: biological relevance-a review." *Gene* 40(1): 1-8.
 66. **Dunn, E. F., D. C. Pritlove, H. Jin and R. M. Elliott** (1995). "Transcription of a recombinant bunyavirus RNA template by transiently expressed bunyavirus proteins." *Virology* 211(1): 133-143.
 67. **Dupont, N., A. C. Nascimbeni, E. Morel and P. Codogno** (2017). "Molecular Mechanisms of Noncanonical Autophagy." *Int Rev Cell Mol Biol* 328: 1-23.
 68. **Echavarria-Consuegra, L., J. M. Smit and F. Reggiori** (2019). "Role of autophagy during the replication and pathogenesis of common mosquito-borne flavi- and alphaviruses." *Open Biol* 9(3): 190009.
 69. **Eichwald, C., J. F. Rodriguez and O. R. Burrone** (2004). "Characterization of rotavirus NSP2/NSP5 interactions and the dynamics of viroplasm formation." *J Gen Virol* 85(Pt 3): 625-634.
-

-
70. **Eifan, S. A. and R. M. Elliott** (2009). "Mutational analysis of the Bunyamwera orthobunyavirus nucleocapsid protein gene." *J Virol* 83(21): 11307-11317.
 71. **Elechiguerra, J. L., J. L. Burt, J. R. Morones, A. Camacho-Bragado, X. Gao, H. H. Lara and M. J. Yacaman** (2005). "Interaction of silver nanoparticles with HIV-1." *J Nanobiotechnology* 3: 6.
 72. **Elliott, R. M.** (1990). "Molecular biology of the Bunyaviridae." *J Gen Virol* 71 (Pt 3): 501-522.
 73. **Elliott, R. M.** (2009). "Bunyaviruses and climate change." *Clin Microbiol Infect* 15(6): 510-517.
 74. **Endres, C. J., A. M. Moss, R. Govindarajan, D. S. Choi and J. D. Unadkat** (2009). "The role of nucleoside transporters in the erythrocyte disposition and oral absorption of ribavirin in the wild-type and equilibrative nucleoside transporter 1-/- mice." *J Pharmacol Exp Ther* 331(1): 287-296.
 75. **Eriksson, B., E. Helgstrand, N. G. Johansson, A. Larsson, A. Misiorny, J. O. Noren, L. Philipson, K. Stenberg, G. Stening, S. Stridh and B. Oberg** (1977). "Inhibition of influenza virus ribonucleic acid polymerase by ribavirin triphosphate." *Antimicrob Agents Chemother* 11(6): 946-951.
 76. **Espy, N., U. Perez-Sautu, E. Ramirez de Arellano, A. Negredo, M. R. Wiley, S. Bavari, M. Diaz Menendez, M. P. Sanchez-Seco and G. Palacios** (2018). "Ribavirin Had Demonstrable Effects on the Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus (CCHFV) Population and Load in a Patient With CCHF Infection." *J Infect Dis* 217(12): 1952-1956.
 77. **Ewald, P. W.** (1994). "Evolution of mutation rate and virulence among human retroviruses." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 346(1317): 333-341; discussion 341-333.
 78. **Ewald, P. W.** (1994). "Evolution of infectious diseases". Oxford University Press, Oxford, UK.
 79. **Fazakerley, J. K., A. Boyd, M. L. Mikkola and L. Kaariainen** (2002). "A single amino acid change in the nuclear localization sequence of the nsP2 protein affects the neurovirulence of Semliki Forest virus." *J Virol* 76(1): 392-396.
 80. **Fernandez de Castro I., and C. Risco** (2014). "Imaging RNA virus replication assemblies: bunyaviruses and reoviruses". *Future Virology*. 9 (12): 1089-1104.
 81. **Fernandez de Castro, I., J. J. Fernandez, D. Barajas, P. D. Nagy and C. Risco** (2017). "Three-dimensional imaging of the intracellular assembly of a functional viral RNA replicase complex." *J Cell Sci* 130(1): 260-268.
 82. **Fisher-Hoch, S. P., J. A. Khan, S. Rehman, S. Mirza, M. Khurshid and J. B. McCormick** (1995). "Crimean Congo-haemorrhagic fever treated with oral ribavirin." *Lancet* 346(8973): 472-475.
 83. **Flather, D. and B. L. Semler** (2015). "Picornaviruses and nuclear functions: targeting a cellular compartment distinct from the replication site of a positive-strand RNA virus." *Front Microbiol* 6: 594.
 84. **Flick, R. and R. F. Pettersson** (2001). "Reverse genetics system for Uukuniemi virus (Bunyaviridae): RNA polymerase I-catalyzed expression of chimeric viral RNAs." *J Virol* 75(4): 1643-1655.
 85. **Fontana, J., N. Lopez-Montero, R. M. Elliott, J. J. Fernandez and C. Risco** (2008). "The unique architecture of Bunyamwera virus factories around the Golgi complex." *Cell Microbiol* 10(10): 2012-2028.
 86. **Franco, E. J., J. L. Rodriguez, J. J. Pomeroy, K. C. Hanrahan and A. N. Brown** (2018). "The effectiveness of antiviral agents with broad-spectrum activity against chikungunya virus varies between host cell lines." *Antivir Chem Chemother* 26: 2040206618807580.
 87. **Gao, G. and H. Luo** (2006). "The ubiquitin-proteasome pathway in viral infections". *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 84. 5-14. 10.1139/y05-144.
-

-
88. **Garcia-Serradilla, M., C. Risco and B. Pacheco** (2019). "Drug repurposing for new, efficient, broad spectrum antivirals." *Virus Res* 264: 22-31.
 89. **García-Serradilla, M., and C. Risco.** "Ribavirin and silver nano-particles block Bunyamwera virus infection by disrupting the integrity of the viral replication organelles" (*en preparación*).
 90. **Gencer D., Bayramoglu Z., Nalcacioglu R., Kleespies R. G., Demirbag Z., Demir I.** (2018). Characterisation of three Alphabaculovirus isolates from the gypsy moth, *Lymantria dispar dispar* (Lepidoptera: Erebidæ), in Turkey. *Biocontr. Sci. Technol.* 28, 107–121.
 91. **Gentile, M. and H. R. Gelderblom** (2014). "Electron microscopy in rapid viral diagnosis: an update." *New Microbiol* 37(4): 403-422.
 92. **Giepmans, B. N., S. R. Adams, M. H. Ellisman and R. Y. Tsien** (2006). "The fluorescent toolbox for assessing protein location and function." *Science* 312(5771): 217-224.
 93. **Gilbert, B. E. and P. R. Wyde** (1988). "Pharmacokinetics of ribavirin aerosol in mice." *Antimicrob Agents Chemother* 32(1): 117-121.
 94. **Gliga, A. R., S. Skoglund, I. O. Wallinder, B. Fadeel and H. L. Karlsson** (2014). "Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: the role of cellular uptake, agglomeration and Ag release." *Part Fibre Toxicol* 11: 11.
 95. **Gong, C. P., S. C. Li and R. Y. Wang** (2018). "Development of biosynthesized silver nanoparticles based formulation for treating wounds during nursing care in hospitals." *J Photochem Photobiol B* 183: 137-141.
 96. **Goswami, B. B., E. Borek, O. K. Sharma, J. Fujitaki and R. A. Smith** (1979). "The broad spectrum antiviral agent ribavirin inhibits capping of mRNA." *Biochem Biophys Res Commun* 89(3): 830-836.
 97. **Gould, E. A. and S. Higgs** (2009). "Impact of climate change and other factors on emerging arbovirus diseases." *Trans R Soc Trop Med Hyg* 103(2): 109-121.
 98. **Gould, E., J. Pettersson, S. Higgs, R. Charrel and X. de Lamballerie** (2017). "Emerging arboviruses: Why today?" *One Health* 4: 1-13.
 99. **Gouzil, J., A. Fablet, E. Lara, G. Caignard, M. Cochet, C. Kundlacz, M. Palmarini, M. Varela, E. Breard, C. Sailleau, C. Viarouge, M. Culpier, S. Zientara and D. Vitour** (2017). "Nonstructural Protein NSs of Schmallenberg Virus Is Targeted to the Nucleolus and Induces Nucleolar Disorganization." *J Virol* 91(1).
 100. **Graci, J. D. and C. E. Cameron** (2006). "Mechanisms of action of ribavirin against distinct viruses." *Rev Med Virol* 16(1): 37-48.
 101. **Gratz, N. G.** (2004). "Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*." *Med Vet Entomol* 18(3): 215-227.
 102. **Gubler D.J.** (2002). The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Arch Med Res.* 33, 330-342.
 103. **Gurunathan, S., K. Kalishwaralal, R. Vaidyanathan, D. Venkataraman, S. R. Pandian, J. Muniyandi, N. Hariharan and S. H. Eom** (2009). "Biosynthesis, purification and characterization of silver nanoparticles using *Escherichia coli*." *Colloids Surf B Biointerfaces* 74(1): 328-335.
 104. **Hafiz M.Y., S. U. Mahmood, M. Shoaib, and F. H. Yusuf** (2016). "Concern over Zika virus outbreak: another alarming global threat". *Infect Drug Resist.* 9:149–151.
 105. **Haggag, E. G., A. M. Elshamy, M. A. Rabeh, N. M. Gabr, M. Salem, K. A. Youssif, A. Samir, A. Bin Muhsinah, A. Alsayari and U. R. Abdelmohsen** (2019). "Antiviral potential of green synthesized silver nanoparticles of *Lampranthus coccineus* and *Malephora lutea*." *Int J Nanomedicine* 14: 6217-6229.
-

-
106. **Han, Y. H., H. J. Moon, B. R. You and W. H. Park** (2009). "The effect of MG132, a proteasome inhibitor on HeLa cells in relation to cell growth, reactive oxygen species and GSH." *Oncol Rep* 22(1): 215-221.
 107. **Harrison S.C.** (2015). "Viral membrane fusion." *Virology*. 498–507.
 108. **Harvell, C. D., C. E. Mitchell, J. R. Ward, S. Altizer, A. P. Dobson, R. S. Ostfeld and M. D. Samuel** (2002). "Climate warming and disease risks for terrestrial and marine biota." *Science* 296(5576): 2158-2162.
 109. **Hinson, E. R., S. M. Shone, M. C. Zink, G. E. Glass and S. L. Klein** (2004). "Wounding: the primary mode of Seoul virus transmission among male Norway rats." *Am J Trop Med Hyg* 70(3): 310-317.
 110. **Holmes, E. C. and A. Moya** (2002). "Is the quasispecies concept relevant to RNA viruses?" *J Virol* 76(1): 460-465.
 111. **Hong, Y., M. Bai, X. Qi, C. Li, M. Liang, D. Li, C. J. Cardona and Z. Xing** (2019). "Suppression of the IFN- α and - β Induction through Sequestering IRF7 into Viral Inclusion Bodies by Nonstructural Protein NSs in Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Bunyavirus Infection." *The Journal of Immunology* 202(3): 841-856.
 112. **Horie, M., H. Kato, K. Fujita, S. Endoh and H. Iwahashi** (2012). "In vitro evaluation of cellular response induced by manufactured nanoparticles." *Chem Res Toxicol* 25(3): 605-619.
 113. **Hover, S., B. Foster, J. Fontana, A. Kohl, S. A. N. Goldstein, J. N. Barr and J. Mankouri** (2018). "Bunyavirus requirement for endosomal K⁺ reveals new roles of cellular ion channels during infection." *PLoS Pathog* 14(1): e1006845.
 114. **Howard, C. R., and N. F. Fletcher** (2012). "Emerging virus diseases: can we ever expect the unexpected?." *Emerging microbes & infections*, 1(12), e46.
 115. **Hsin Y. H., C. F. Chen, S. Huang, T. S. Shih, P. S. Lai, and P. J. Chueh** (2008). "The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells." *Toxicol. Lett.* 179:130–139.
 116. **Huggins, J. W.** (1989). "Prospects for treatment of viral hemorrhagic fevers with ribavirin, a broad-spectrum antiviral drug." *Rev Infect Dis* 11 Suppl 4: S750-761.
 117. **Hussain, S. M., K. L. Hess, J. M. Gearhart, K. T. Geiss and J. J. Schlager** (2005). "In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells." *Toxicol In Vitro* 19(7): 975-983.
 118. **Ibarra, K. D. and J. K. Pfeiffer** (2009). "Reduced ribavirin antiviral efficacy via nucleoside transporter-mediated drug resistance." *J Virol* 83(9): 4538-4547.
 119. **Ilyin, G. P., S. Langouet, M. Rissel, J. G. Delcros, A. Guillouzo and C. Guguen-Guillouzo** (1998). "Ribavirin inhibits protein synthesis and cell proliferation induced by mitogenic factors in primary human and rat hepatocytes." *Hepatology* 27(6): 1687-1694.
 120. **Isaacson, M. K. and H. L. Ploegh** (2009). "Ubiquitination, ubiquitin-like modifiers, and deubiquitination in viral infection." *Cell Host Microbe* 5(6): 559-570.
 121. **Iyidogan, P. and K. S. Anderson** (2014). "Current perspectives on HIV-1 antiretroviral drug resistance." *Viruses* 6(10): 4095-4139.
 122. **Jackson, W. T., T. H. Giddings, Jr., M. P. Taylor, S. Mulinyawe, M. Rabinovitch, R. R. Kopito and K. Kirkegaard** (2005). "Subversion of cellular autophagosomal machinery by RNA viruses." *PLoS Biol* 3(5): e156.
 123. **Jain, R. K., P. B. Joyce, M. Molinete, P. A. Halban and S. U. Gorr** (2001). "Oligomerization of green fluorescent protein in the secretory pathway of endocrine cells." *Biochem J* 360(Pt 3): 645-649.
 124. **James, A., Y. Wang, H. Raje, R. Rosby and P. DiMario** (2014). "Nucleolar stress with and without p53." *Nucleus* 5(5): 402-426.
 125. **Jansen, C. C. and N. W. Beebe** (2010). "The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next." *Microbes Infect* 12(4): 272-279.
-

126. **Jarvis, S. M., J. A. Thorn and P. Glue** (1998). "Ribavirin uptake by human erythrocytes and the involvement of nitrobenzylthioinosine-sensitive (es)-nucleoside transporters." *Br J Pharmacol* 123(8): 1587-1592.
127. **Jimmerson, L. C., J. H. Zheng, L. R. Bushman, C. E. MacBrayne, P. L. Anderson and J. J. Kiser** (2014). "Development and validation of a dried blood spot assay for the quantification of ribavirin using liquid chromatography coupled to mass spectrometry." *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 944: 18-24.
128. **Jin, H. and R. M. Elliott** (1991). "Expression of functional Bunyamwera virus L protein by recombinant vaccinia viruses." *J Virol* 65(8): 4182-4189.
129. **Jin, H. and R. M. Elliott** (1992). "Mutagenesis of the L protein encoded by Bunyamwera virus and production of monospecific antibodies." *J Gen Virol* 73 (Pt 9): 2235-2244.
130. **Jin, H. and R. M. Elliott** (1993). "Characterization of Bunyamwera virus S RNA that is transcribed and replicated by the L protein expressed from recombinant vaccinia virus." *J Virol* 67(3): 1396-1404.
131. **Jones, K. E., N. G. Patel, M. A. Levy, A. Storeygard, D. Balk, J. L. Gittleman and P. Daszak** (2008). "Global trends in emerging infectious diseases." *Nature* 451(7181): 990-993.
132. **Jones, M. E.** (1980). "Pyrimidine nucleotide biosynthesis in animals: genes, enzymes, and regulation of UMP biosynthesis." *Annu Rev Biochem* 49: 253-279.
133. **Kang, J., S. Park, P. Lee, and B. Ahn** (1999). "Apoptosis Is Induced by Hantaviruses in Cultured Cells". *Virology*. 264. 99-105. 10.1006/viro.1999.9896.
134. **Karabatsos, N.** (1978). "Supplement to International Catalogue of Arboviruses including certain other viruses of vertebrates." *Am J Trop Med Hyg* 27(2 Pt 2 Suppl): 372-440.
135. **Katze, M. G., Y. He and M. Gale, Jr.** (2002). "Viruses and interferon: a fight for supremacy." *Nat Rev Immunol* 2(9): 675-687.
136. **Khan, M., G. H. Syed, S. J. Kim and A. Siddiqui** (2015). "Mitochondrial dynamics and viral infections: A close nexus." *Biochim Biophys Acta* 1853(10 Pt B): 2822-2833.
137. **Kihira, S., J. Uematsu, M. Kawano, A. Itoh, A. Ookohchi, S. Satoh, Y. Maeda, K. Sakai, H. Yamamoto, M. Tsurudome, M. O'Brien and H. Komada** (2014). "Ribavirin inhibits human parainfluenza virus type 2 replication in vitro." *Microbiol Immunol* 58(11): 628-635.
138. **Kohl, A., R. F. Clayton, F. Weber, A. Bridgen, R. E. Randall and R. M. Elliott** (2003). "Bunyamwera virus nonstructural protein NSs counteracts interferon regulatory factor 3-mediated induction of early cell death." *J Virol* 77(14): 7999-8008.
139. **Kraemer, M. U. G., R. C. Reiner, Jr., O. J. Brady, J. P. Messina, M. Gilbert, D. M. Pigott, D. Yi, K. Johnson, L. Earl, L. B. Marczak, S. Shirude, N. Davis Weaver, D. Bisanzio, T. A. Perkins, S. Lai, X. Lu, P. Jones, G. E. Coelho, R. G. Carvalho, W. Van Bortel, C. Marsboom, G. Hendrickx, F. Schaffner, C. G. Moore, H. H. Nax, L. Bengtsson, E. Wetter, A. J. Tatem, J. S. Brownstein, D. L. Smith, L. Lambrechts, S. Cauchemez, C. Linard, N. R. Faria, O. G. Pybus, T. W. Scott, Q. Liu, H. Yu, G. R. W. Wint, S. I. Hay and N. Golding** (2019). "Past and future spread of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*." *Nat Microbiol* 4(5): 854-863.
140. **Krillov, L. R.** (2001). "Respiratory Syncytial Virus: Update on Infection, Treatment, and Prevention." *Curr Infect Dis Rep* 3(3): 242-246.
141. **Kuno, G. and G. J. Chang** (2005). "Biological transmission of arboviruses: reexamination of and new insights into components, mechanisms, and unique traits as well as their evolutionary trends." *Clin Microbiol Rev* 18(4): 608-637.
142. **Lambrechts, L., T. W. Scott and D. J. Gubler** (2010). "Consequences of the expanding global distribution of *Aedes albopictus* for dengue virus transmission." *PLoS Negl Trop Dis* 4(5): e646.

143. **Lanford, R. E., D. Chavez, B. Guerra, J. Y. Lau, Z. Hong, K. M. Brasky and B. Beames** (2001). "Ribavirin induces error-prone replication of GB virus B in primary tamarin hepatocytes." *J Virol* 75(17): 8074-8081.
144. **Lappin, D. F., G. W. Nakitare, J. W. Palfreyman and R. M. Elliott** (1994). "Localization of Bunyamwera bunyavirus G1 glycoprotein to the Golgi requires association with G2 but not with NSm." *J Gen Virol* 75 (Pt 12): 3441-3451.
145. **Lara, H. H., L. Ixtepan-Turrent, E. N. Garza-Trevino and C. Rodriguez-Padilla** (2010). "PVP-coated silver nanoparticles block the transmission of cell-free and cell-associated HIV-1 in human cervical culture." *J Nanobiotechnology* 8: 15.
146. **Lednicky, J. A.** (2003). "Hantaviruses. a short review." *Arch Pathol Lab Med* 127(1): 30-35.
147. **Lee, M. J., K. H. Kim, J. Yi, S. J. Choi, P. G. Choe, W. B. Park, N. J. Kim and M. D. Oh** (2017). "In vitro antiviral activity of ribavirin against severe fever with thrombocytopenia syndrome virus." *Korean J Intern Med* 32(4): 731-737.
148. **Leonard, V. H., A. Kohl, T. J. Hart and R. M. Elliott** (2006). "Interaction of Bunyamwera Orthobunyavirus NSs protein with mediator protein MED8: a mechanism for inhibiting the interferon response." *J Virol* 80(19): 9667-9675.
149. **Leta, S., T. J. Beyene, E. M. De Clercq, K. Amenu, M. U. G. Kraemer and C. W. Revie** (2018). "Global risk mapping for major diseases transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*." *Int J Infect Dis* 67: 25-35.
150. **Li, G. and E. De Clercq** (2017). "Current therapy for chronic hepatitis C: The role of direct-acting antivirals." *Antiviral Res* 142: 83-122.
151. **Lin, C. X., S. Y. Yang, J. L. Gu, J. Meng, H. Y. Xu and J. M. Cao** (2017). "The acute toxic effects of silver nanoparticles on myocardial transmembrane potential, INa and IK1 channels and heart rhythm in mice." *Nanotoxicology* 11(6): 827-837.
152. **Lin, K. and P. Gallay** (2013). "Curing a viral infection by targeting the host: the example of cyclophilin inhibitors." *Antiviral Res* 99(1): 68-77.
153. **Lopez-Montero, N. and C. Risco** (2011). "Self-protection and survival of arbovirus-infected mosquito cells." *Cell Microbiol* 13(2): 300-315.
154. **Lorenz, C., T. S. Azevedo, F. Virginio, B. S. Aguiar, F. Chiaravalloti-Neto and L. Suesdek** (2017). "Impact of environmental factors on neglected emerging arboviral diseases." *PLoS Negl Trop Dis* 11(9): e0005959.
155. **Lowen, R. G., T. M. Bocan, C. D. Kane, L. H. Cazares, K. P. Kota, J. T. Ladner, F. Nasar, L. Pitt, D. R. Smith, V. Soloveva, M. G. Sun, X. Zeng and S. Bavari** (2018). "Countering Zika Virus: The USAMRIID Response." *Adv Exp Med Biol* 1062: 303-318.
156. **Lozach P.Y., R. Mancini, D. Bitto, R. Meier, L. Oestereich , A. K. Overby, R. F. Pettersson, and A. Helenius** (2010). "Entry of Bunyaviruses into mammalian cells". *Cell Host Microbe*. 7 (6),488-99
157. **Lu, L., R. W. Sun, R. Chen, C. K. Hui, C. M. Ho, J. M. Luk, G. K. Lau and C. M. Che** (2008). "Silver nanoparticles inhibit hepatitis B virus replication." *Antivir Ther* 13(2): 253-262.
158. **Luther, E. M., Y. Koehler, J. Diendorf, M. Eppe and R. Dringen** (2011). "Accumulation of silver nanoparticles by cultured primary brain astrocytes." *Nanotechnology* 22(37): 375101.
159. **Ly, H. J. and T. Ikegami** (2016). "Rift Valley fever virus NSs protein functions and the similarity to other bunyavirus NSs proteins." *Virol J* 13: 118.
160. **Lyles, D. S.** (2000). "Cytopathogenesis and inhibition of host gene expression by RNA viruses." *Microbiol Mol Biol Rev* 64(4): 709-724.
161. **Mackenzie, J. S. and H. E. Field** (2004). "Emerging encephalitogenic viruses: lyssaviruses and henipaviruses transmitted by frugivorous bats." *Arch Virol Suppl*(18): 97-111.

-
162. **Maes, P., S. Adkins, S. V. Alkhovsky, T. Avsic-Zupanc, M. J. Ballinger, D. A. Bente, M. Beer, E. Bergeron, C. D. Blair, T. Briese, M. J. Buchmeier, F. J. Burt, C. H. Calisher, R. N. Charrel, I. R. Choi, J. C. S. Clegg, J. C. de la Torre, X. de Lamballerie, J. L. DeRisi, M. Digiaro, M. Drebot, H. Ebihara, T. Elbeaino, K. Ergunay, C. F. Fulhorst, A. R. Garrison, G. F. Gao, J. J. Gonzalez, M. H. Groschup, S. Gunther, A. L. Haenni, R. A. Hall, R. Hewson, H. R. Hughes, R. K. Jain, M. G. Jonson, S. Junglen, B. Klempa, J. Klingstrom, R. Kormelink, A. J. Lambert, S. A. Langevin, I. S. Lukashevich, M. Marklewitz, G. P. Martelli, N. Mielke-Ehret, A. Mirazimi, H. P. Muhlbach, R. Naidu, M. R. T. Nunes, G. Palacios, A. Papa, J. T. Paweska, C. J. Peters, A. Plyusnin, S. R. Radoshitzky, R. O. Resende, V. Romanowski, A. A. Sall, M. S. Salvato, T. Sasaya, C. Schmaljohn, X. Shi, Y. Shirako, P. Simmonds, M. Sironi, J. W. Song, J. R. Spengler, M. D. Stenglein, R. B. Tesh, M. Turina, T. Wei, A. E. Whitfield, S. D. Yeh, F. M. Zerbini, Y. Z. Zhang, X. Zhou and J. H. Kuhn** (2019). "Taxonomy of the order Bunyavirales: second update 2018." *Arch Virol* 164(3): 927-941.
163. **Maltezou, H. C. and A. Papa** (2010). "Crimean-Congo hemorrhagic fever: risk for emergence of new endemic foci in Europe?" *Travel Med Infect Dis* 8(3): 139-143.
164. **Matthews, D.A., E. Emmott, and J. A. Hiscox** (2011). "Viruses and nucleolus. In *The Nucleolus*". Olson, M.O. (ed.). New York: Springer, pp. 321–345.
165. **McLean, J. E., A. Wudzinska, E. Datan, D. Quaglino and Z. Zakeri** (2011). "Flavivirus NS4A-induced autophagy protects cells against death and enhances virus replication." *J Biol Chem* 286(25): 22147-22159.
166. **Mehrbod P., N. Motamed, M. Tabatabaian, R. Soleimani Estyar, E. Amini, and M. Shahidi** (2009). "In Vitro Antiviral Effect of "Nanosilver" on Influenza Virus." *DARU* 17:88-93.
167. **Mejer, N., U. Fahnoe, A. Galli, S. Ramirez, T. Benfield and J. Bukh** (2018). "Ribavirin-induced mutagenesis across the complete open reading frame of hepatitis C virus genotypes 1a and 3a." *J Gen Virol* 99(8): 1066-1077.
168. **Menendez-Arias, L., M. Alvarez and B. Pacheco** (2014). "Nucleoside/nucleotide analog inhibitors of hepatitis B virus polymerase: mechanism of action and resistance." *Curr Opin Virol* 8: 1-9.
169. **Mercorelli, B., G. Palu and A. Loregian** (2018). "Drug Repurposing for Viral Infectious Diseases: How Far Are We?" *Trends Microbiol* 26(10): 865-876.
170. **Mori, K., M. Ikeda, Y. Ariumi, H. Dansako, T. Wakita and N. Kato** (2011). "Mechanism of action of ribavirin in a novel hepatitis C virus replication cell system." *Virus Res* 157(1): 61-70.
171. **Mousnier, A., D. Swieboda, A. Pinto, A. Guedan, A. V. Rogers, R. Walton, S. L. Johnston and R. Solari** (2014). "Human rhinovirus 16 causes Golgi apparatus fragmentation without blocking protein secretion." *J Virol* 88(20): 11671-11685.
172. **Muller, W. E., A. Maidhof, H. Taschner and R. K. Zahn** (1977). "Virazole (1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide; a cytostatic agent." *Biochem Pharmacol* 26(11): 1071-1075.
173. **Muller-Reichert, T and P. Verkade (eds)** (2017). *Correlative Light and Electron Microscopy III*, Vol. 140. Amsterdam, Netherlands: Elsevier.
174. **Murugan, K., D. Dinesh, P. J. Kumar, C. Panneerselvam, J. Subramaniam, P. Madhiyazhagan, U. Suresh, M. Nicoletti, A. A. Alarfaj, M. A. Munusamy, A. Higuchi, H. Mehlhorn and G. Benelli** (2015). "Datura metel-synthesized silver nanoparticles magnify predation of dragonfly nymphs against the malaria vector *Anopheles stephensi*." *Parasitol Res* 114(12): 4645-4654.
175. **Murugan, K., P. Aruna, C. Panneerselvam, P. Madhiyazhagan, M. Paulpandi, J. Subramaniam, R. Rajaganesh, H. Wei, M. S. Alsalhi, S. Devanesan, M. Nicoletti, B.**
-

- Syuhei, A. Canale and G. Benelli** (2016). "Fighting arboviral diseases: low toxicity on mammalian cells, dengue growth inhibition (in vitro), and mosquitocidal activity of *Centrocercus clavulatum*-synthesized silver nanoparticles." *Parasitol Res* 115(2): 651-662.
176. **Nakitare, G. W. and R. M. Elliott** (1993). "Expression of the Bunyamwera virus M genome segment and intracellular localization of NSm." *Virology* 195(2): 511-520.
 177. **Nichol S.T., B. Beaty, R. M. Elliott, R. Goldbach, A. Plyusnin, A. R. Schmaljohn, and R.B. Tesh** (2005). "Bunyaviridae", in: *Virus Taxonomy*. Editors: Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U. and Ball, L. A. Amsterdam: Elsevier, 695-716.
 178. **Nosengo, N.** (2016). "Can you teach old drugs new tricks?." *Nature* 534, 314–316.
 179. **Novoa, R. R., G. Calderita, P. Cabezas, R. M. Elliott and C. Risco** (2005). "Key Golgi factors for structural and functional maturation of bunyamwera virus." *J Virol* 79(17): 10852-10863.
 180. **Novoa, R. R., G. Calderita, R. Arranz, J. Fontana, H. Granzow and C. Risco** (2005). "Virus factories: associations of cell organelles for viral replication and morphogenesis." *Biol Cell* 97(2): 147-172.
 181. **Nyström, K., J. Waldenström, K. Tang, and M. Lagging** (2019). "Ribavirin: Pharmacology, multiple modes of action and possible future perspectives." *Future Virology*. 14. 10.2217/fvl-2018-0166.
 182. **O'Hare, H. M., K. Johnsson and A. Gautier** (2007). "Chemical probes shed light on protein function." *Curr Opin Struct Biol* 17(4): 488-494.
 183. **Okafor F., A. Janen A, T. Kukhtareva, V. Edwards, and M. Curley** (2013). "Green Synthesis of Silver Nanoparticles, Their Characterization, Application and Antibacterial Activity". *International journal of environmental research and public health*. 10. 5221-38.
 184. **Oksayan, S., J. Nikolic, C. T. David, D. Blondel, D. A. Jans and G. W. Moseley** (2015). "Identification of a role for nucleolin in rabies virus infection." *J Virol* 89(3): 1939-1943.
 185. **Overby, A. K., R. F. Pettersson, K. Grunewald and J. T. Huiskonen** (2008). "Insights into bunyavirus architecture from electron cryotomography of Uukuniemi virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(7): 2375-2379.
 186. **P, P. S. and K. S. T** (2017). "Antioxidant, antibacterial and cytotoxic potential of silver nanoparticles synthesized using terpenes rich extract of *Lantana camara* L. leaves." *Biochem Biophys Rep* 10: 76-81.
 187. **Page, T. and J. D. Connor** (1990). "The metabolism of ribavirin in erythrocytes and nucleated cells." *Int J Biochem* 22(4): 379-383.
 188. **Papp, I., C. Sieben, K. Ludwig, M. Roskamp, C. Bottcher, S. Schlecht, A. Herrmann and R. Haag** (2010). "Inhibition of influenza virus infection by multivalent sialic-acid-functionalized gold nanoparticles." *Small* 6(24): 2900-2906.
 189. **Parker, W. B.** (2005). "Metabolism and antiviral activity of ribavirin." *Virus Res* 107(2): 165-171.
 190. **Pekosz, A., J. Phillips, D. Pleasure, D. Merry and F. Gonzalez-Scarano** (1996). "Induction of apoptosis by La Crosse virus infection and role of neuronal differentiation and human bcl-2 expression in its prevention." *J Virol* 70(8): 5329-5335.
 191. **Perales, C., J. Quer, J. Gregori, J. I. Esteban and E. Domingo** (2015). "Resistance of Hepatitis C Virus to Inhibitors: Complexity and Clinical Implications." *Viruses* 7(11): 5746-5766.
 192. **Pollitt, E., J. Zhao, P. Muscat and R. M. Elliott** (2006). "Characterization of Maguari orthobunyavirus mutants suggests the nonstructural protein NSm is not essential for growth in tissue culture." *Virology* 348(1): 224-232.

-
193. **Pongrac, I. M., L. B. Ahmed, H. Mlinaric, D. D. Jurasin, I. Pavicic, A. M. Marjanovic Cermak, M. Milic, S. Gajovic and I. Vinkovic Vrcek** (2018). "Surface coating affects uptake of silver nanoparticles in neural stem cells." *J Trace Elem Med Biol* 50: 684-692.
194. **Rankin, J. T., Jr., S. B. Eppes, J. B. Antczak and W. K. Joklik** (1989). "Studies on the mechanism of the antiviral activity of ribavirin against reovirus." *Virology* 168(1): 147-158.
195. **Rawlinson, S. M. and G. W. Moseley** (2015). "The nucleolar interface of RNA viruses." *Cell Microbiol* 17(8): 1108-1120.
196. **Reshi, L., H. Wang, and J. Hong** (2018). "Modulation of Mitochondria During Viral Infections". IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.73036.
197. **Ribeiro, A. P. C., S. Anbu, E. Alegria, A. R. Fernandes, P. V. Baptista, R. Mendes, A. S. Matias, M. Mendes, M. F. C. Guedes da Silva and A. J. L. Pombeiro** (2018). "Evaluation of cell toxicity and DNA and protein binding of green synthesized silver nanoparticles." *Biomed Pharmacother* 101: 137-144.
198. **Richert-Poggeler, K. R., K. Franzke, K. Hipp and R. G. Kleespies** (2018). "Electron Microscopy Methods for Virus Diagnosis and High Resolution Analysis of Viruses." *Front Microbiol* 9: 3255.
199. **Risco, C., I. F. de Castro, L. Sanz-Sanchez, K. Narayan, G. Grandinetti and S. Subramaniam** (2014). "Three-Dimensional Imaging of Viral Infections." *Annu Rev Virol* 1(1): 453-473.
200. **Robinson, C. V., A. Sali and W. Baumeister** (2007). "The molecular sociology of the cell." *Nature* 450(7172): 973-982.
201. **Rusnak, J. M.** (2011). "Experience with Ribavirin for Treatment and Postexposure Prophylaxis of Hemorrhagic Fever Viruses: Crimean Congo Hemorrhagic Fever, Lassa Fever, and Hantaviruses". *Applied Biosafety*, 16(2), 67–87.
202. **Russmann, S., I. Grattagliano, P. Portincasa, V. O. Palmieri and G. Palasciano** (2006). "Ribavirin-induced anemia: mechanisms, risk factors and related targets for future research." *Curr Med Chem* 13(27): 3351-3357.
203. **Sachse, M., I. F. de Castro, G. Fournier, N. Naffakh and C. Risco** (2018). "Metal-Tagging Transmission Electron Microscopy and Immunogold Labeling on Tokuyasu Cryosections to Image Influenza A Virus Ribonucleoprotein Transport and Packaging." *Methods Mol Biol* 1836: 281-301.
204. **Sachse, M., I. F. de Castro, R. Tenorio, C. Risco** (2019). "Chapter One - The viral replication organelles within cells studied by electron microscopy". *Advances in Virus Research*. Volume 105: 1-33.
205. **Safronetz, D., E. Haddock, F. Feldmann, H. Ebihara and H. Feldmann** (2011). "In vitro and in vivo activity of ribavirin against Andes virus infection." *PLoS One* 6(8): e23560.
206. **Salanueva, I. J., R. R. Novoa, P. Cabezas, C. Lopez-Iglesias, J. L. Carrascosa, R. M. Elliott and C. Risco** (2003). "Polymorphism and structural maturation of bunyamwera virus in Golgi and post-Golgi compartments." *J Virol* 77(2): 1368-1381.
207. **Sanz-Sanchez, L. and C. Risco** (2013). "Multilamellar structures and filament bundles are found on the cell surface during bunyavirus egress." *PLoS One* 8(6): e65526.
208. **Satoh, S., D. Onomura, Y. Ueda, H. Dansako, M. Honda, S. Kaneko and N. Kato** (2019). "Ribavirin-induced down-regulation of CCAAT/enhancer-binding protein alpha leads to suppression of lipogenesis." *Biochem J* 476(1): 137-149.
209. **Satoh, S., K. Mori, D. Onomura, Y. Ueda, H. Dansako, M. Honda, S. Kaneko, M. Ikeda and N. Kato** (2017). "Ribavirin suppresses hepatic lipogenesis through inosine monophosphate dehydrogenase inhibition: Involvement of adenosine monophosphate-activated protein kinase-related kinases and retinoid X receptor alpha." *Hepatol Commun* 1(6): 550-563.
-

-
210. **Schmaljohn, C.S., and Hooper J.W.** (2001). "Bunyaviridae". In DM Knipe and Fields PM. Eds. Lippincott Williams & Wilkins Howley. Philadelphia. Virology, 4th ed, pp. 1581–1602
211. **Schmaljohn, C.S., and S. T. Nichol** (2007). "Bunyaviridae". In Fields of Virology. Knipe, D.H.y.H., P.H. Lippincott, Williams y Wilkins (ed.) Philadelphia, pp. 1741-1789.
212. **Scott, I.** (2010). "The role of mitochondria in the mammalian antiviral defense system." *Mitochondrion* 10(4): 316-320.
213. **Shah, N. R., A. Sunderland and V. Z. Grdzlishvili** (2010). "Cell type mediated resistance of vesicular stomatitis virus and Sendai virus to ribavirin." *PLoS One* 5(6): e11265.
214. **Sharma, G., J. S. Nam, A. R. Sharma and S. S. Lee** (2018). "Antimicrobial Potential of Silver Nanoparticles Synthesized Using Medicinal Herb *Coptidis rhizome*." *Molecules* 23(9).
215. **Sharma, V., S. Kaushik, P. Pandit, D. Dhull, J. P. Yadav and S. Kaushik** (2019). "Green synthesis of silver nanoparticles from medicinal plants and evaluation of their antiviral potential against chikungunya virus." *Appl Microbiol Biotechnol* 103(2): 881-891.
216. **Shi, X. and R. M. Elliott** (2009). "Generation and analysis of recombinant Bunyamwera orthobunyaviruses expressing V5 epitope-tagged L proteins." *J Gen Virol* 90(Pt 2): 297-306.
217. **Shi, X., A. Kohl, P. Li and R. M. Elliott** (2007). "Role of the cytoplasmic tail domains of Bunyamwera orthobunyavirus glycoproteins Gn and Gc in virus assembly and morphogenesis." *J Virol* 81(18): 10151-10160.
218. **Shi, X., A. Kohl, V. H. Leonard, P. Li, A. McLees and R. M. Elliott** (2006). "Requirement of the N-terminal region of orthobunyavirus nonstructural protein NSm for virus assembly and morphogenesis." *J Virol* 80(16): 8089-8099.
219. **Shi, X., C. H. Botting, P. Li, M. Niglas, B. Brennan, S. L. Shirran, A. M. Szemiel and R. M. Elliott** (2016). "Bunyamwera orthobunyavirus glycoprotein precursor is processed by cellular signal peptidase and signal peptide peptidase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 113(31): 8825-8830.
220. **Shi, X., D. F. Lappin and R. M. Elliott** (2004). "Mapping the Golgi targeting and retention signal of Bunyamwera virus glycoproteins." *J Virol* 78(19): 10793-10802.
221. **Shi, X., J. T. van Mierlo, A. French and R. M. Elliott** (2010). "Visualizing the replication cycle of bunyamwera orthobunyavirus expressing fluorescent protein-tagged Gc glycoprotein." *J Virol* 84(17): 8460-8469.
222. **Shi, X., K. Brauburger and R. M. Elliott** (2005). "Role of N-linked glycans on bunyamwera virus glycoproteins in intracellular trafficking, protein folding, and virus infectivity." *J Virol* 79(21): 13725-13734.
223. **Shimajima, M., S. Fukushi, H. Tani, T. Yoshikawa, A. Fukuma, S. Taniguchi, Y. Suda, K. Maeda, T. Takahashi, S. Morikawa and M. Saijo** (2014). "Effects of ribavirin on severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in vitro." *Jpn J Infect Dis* 67(6): 423-427.
224. **Sidwell, R. W. and D. F. Smees** (2003). "Viruses of the Bunya- and Togaviridae families: potential as bioterrorism agents and means of control." *Antiviral Res* 57(1-2): 101-111.
225. **Sidwell, R. W., J. H. Huffman, G. P. Khare, L. B. Allen, J. T. Witkowski and R. K. Robins** (1972). "Broad-spectrum antiviral activity of Virazole: 1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide." *Science* 177(4050): 705-706.
226. **Silvas, J. A., V. L. Popov, A. Paulucci-Holthausen and P. V. Aguilar** (2016). "Extracellular Vesicles Mediate Receptor-Independent Transmission of Novel Tick-Borne Bunyavirus." *J Virol* 90(2): 873-886.
227. **Smees, D. F. and R. W. Sidwell** (2003). "A review of compounds exhibiting anti-orthopoxvirus activity in animal models." *Antiviral Res* 57(1-2): 41-52.
228. **Smees, D. F. and T. R. Matthews** (1986). "Metabolism of ribavirin in respiratory syncytial virus-infected and uninfected cells." *Antimicrob Agents Chemother* 30(1): 117-121.
-

-
229. **Smee, D. F., K. W. Bailey, A. C. Morrison and R. W. Sidwell** (2002). "Combination treatment of influenza A virus infections in cell culture and in mice with the cyclopentane neuraminidase inhibitor RWJ-270201 and ribavirin." *Chemotherapy* 48(2): 88-93.
230. **Smithburn, K. C., A. J. Haddow and A. F. Mahaffy** (1946). "A neurotropic virus isolated from Aedes mosquitoes caught in the Semliki forest." *Am J Trop Med Hyg* 26: 189-208.
231. **Soldan, S. S. and F. Gonzalez-Scarano** (2005). "Emerging infectious diseases: the Bunyaviridae." *J Neurovirol* 11(5): 412-423.
232. **Speshock, J. L., R. C. Murdock, L. K. Braydich-Stolle, A. M. Schrand and S. M. Hussain** (2010). "Interaction of silver nanoparticles with Tacaribe virus." *J Nanobiotechnology* 8: 19.
233. **Spiegel, M., T. Plegge and S. Pohlmann** (2016). "The Role of Phlebovirus Glycoproteins in Viral Entry, Assembly and Release." *Viruses* 8(7).
234. **Streeter, D. G., J. T. Witkowski, G. P. Khare, R. W. Sidwell, R. J. Bauer, R. K. Robins and L. N. Simon** (1973). "Mechanism of action of 1-β-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide (Virazole), a new broad-spectrum antiviral agent." *Proc Natl Acad Sci U S A* 70(4): 1174-1178.
235. **Sujitha, V., K. Murugan, M. Paulpandi, C. Panneerselvam, U. Suresh, M. Roni, M. Nicoletti, A. Higuchi, P. Madhiyazhagan, J. Subramaniam, D. Dinesh, C. Vadivalagan, B. Chandramohan, A. A. Alarfaj, M. A. Munusamy, D. R. Barnard and G. Benelli** (2015). "Green-synthesized silver nanoparticles as a novel control tool against dengue virus (DEN-2) and its primary vector Aedes aegypti." *Parasitol Res* 114(9): 3315-3325.
236. **Sun, R. W., R. Chen, N. P. Chung, C. M. Ho, C. L. Lin and C. M. Che** (2005). "Silver nanoparticles fabricated in Hepes buffer exhibit cytoprotective activities toward HIV-1 infected cells." *Chem Commun (Camb)*(40): 5059-5061.
237. **Sun, Y., D. H. Chung, Y. K. Chu, C. B. Jonsson and W. B. Parker** (2007). "Activity of ribavirin against Hantaan virus correlates with production of ribavirin-5'-triphosphate, not with inhibition of IMP dehydrogenase." *Antimicrob Agents Chemother* 51(1): 84-88.
238. **Suresh G., P. H. Gunasekar, D. Kokil, D. Prabhu, D. Dinesh, N. Ravichandran, B. Ramesh, A. Koodalingam, and G. Vijaiyan Siva** (2014). "Green synthesis of silver nanoparticles using Delphinium denudatum root extract exhibits antibacterial and mosquito larvicidal activities". *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 127:61–66.
239. **Sutherland, L.J., A. Anyamba, and A. D. Labeaud** (2013). "Emerging and reemerging human bunyavirus infections and climate change". DOI:10.1002/9781118297469.ch26
240. **Tabachnick, W. J.** (2016). "Climate Change and the Arboviruses: Lessons from the Evolution of the Dengue and Yellow Fever Viruses." *Annu Rev Virol* 3(1): 125-145.
241. **Tabachnick, W. J.** (2016). "Ecological effects on arbovirus-mosquito cycles of transmission." *Curr Opin Virol* 21: 124-131.
242. **Tenorio, R., I. Fernandez de Castro, J. J. Knowlton, P. F. Zamora, C. H. Lee, B. A. Mainou, T. S. Dermody and C. Risco** (2018). "Reovirus sigmaNS and muNS Proteins Remodel the Endoplasmic Reticulum to Build Replication Neo-Organelles." *MBio* 9(4).
243. **Tesh, R. B. and G. B. Modi** (1987). "Maintenance of Toscana virus in Phlebotomus perniciosus by vertical transmission." *Am J Trop Med Hyg* 36(1): 189-193.
244. **Thangamani, S., J. Huang, C. E. Hart, H. Guzman and R. B. Tesh** (2016). "Vertical Transmission of Zika Virus in Aedes aegypti Mosquitoes." *Am J Trop Med Hyg* 95(5): 1169-1173.
245. **Thapa, R., C. Bhagat, P. Shrestha, S. Awal and P. Dudhagara** (2017). "Enzyme-mediated formulation of stable elliptical silver nanoparticles tested against clinical pathogens and MDR bacteria and development of antimicrobial surgical thread." *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 16(1): 39.
-

246. **Thomas, D., G. Blakqori, V. Wagner, M. Banholzer, N. Kessler, R. M. Elliott, O. Haller and F. Weber** (2004). "Inhibition of RNA polymerase II phosphorylation by a viral interferon antagonist." *J Biol Chem* 279(30): 31471-31477.
247. **Thompson, W. H. and B. J. Beaty** (1977). "Venereal transmission of La Crosse (California encephalitis) arbovirus in *Aedes triseriatus* mosquitoes." *Science* 196(4289): 530-531.
248. **Thorley, A. J. and T. D. Tetley** (2013). "New perspectives in nanomedicine." *Pharmacol Ther* 140(2): 176-185.
249. **To, K. K., J. Zhou, J. F. Chan and K. Y. Yuen** (2015). "Host genes and influenza pathogenesis in humans: an emerging paradigm." *Curr Opin Virol* 14: 7-15.
250. **Tokuyasu, K. T.** (1973). "A technique for ultracryotomy of cell suspensions and tissues." *J Cell Biol* 57(2): 551-565.
251. **Tsai T.F. and L. J. Chandler** (2003). Arboviruses. In Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover MC, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed. ASM Press.
252. **Tsai, R. Y. and T. Pederson** (2014). "Connecting the nucleolus to the cell cycle and human disease." *FASEB J* 28(8): 3290-3296.
253. **Ullah Khan, S., T. A. Saleh, A. Wahab, M. H. U. Khan, D. Khan, W. Ullah Khan, A. Rahim, S. Kamal, F. Ullah Khan and S. Fahad** (2018). "Nanosilver: new ageless and versatile biomedical therapeutic scaffold." *Int J Nanomedicine* 13: 733-762.
254. **van Knippenberg, I., R. Frangkoudis and R. M. Elliott** (2013). "The transient nature of Bunyamwera orthobunyavirus NSs protein expression: effects of increased stability of NSs protein on virus replication." *PLoS One* 8(5): e64137.
255. **Vapalahti, O.** (2003). "Rodent and arthropod-borne viral zoonoses in Northern Europe." *Acta Vet Scand Suppl* 100: 69-71.
256. **Vapalahti, O., J. Mustonen, A. Lundkvist, H. Henttonen, A. Plyusnin and A. Vaheri** (2003). "Hantavirus infections in Europe." *Lancet Infect Dis* 3(10): 653-661.
257. **Venugopal, K., H. A. Rather, K. Rajagopal, M. P. Shanthi, K. Sheriff, M. Illiyas, R. A. Rather, E. Manikandan, S. Uvarajan, M. Bhaskar and M. Maaza** (2017). "Synthesis of silver nanoparticles (Ag NPs) for anticancer activities (MCF 7 breast and A549 lung cell lines) of the crude extract of *Syzygium aromaticum*." *J Photochem Photobiol B* 167: 282-289.
258. **Venugopal, K., H. Ahmad, E. Manikandan, K. Thanigai Arul, K. Kavitha, M. K. Moodley, K. Rajagopal, R. Balabhaskar and M. Bhaskar** (2017). "The impact of anticancer activity upon *Beta vulgaris* extract mediated biosynthesized silver nanoparticles (ag-NPs) against human breast (MCF-7), lung (A549) and pharynx (Hep-2) cancer cell lines." *J Photochem Photobiol B* 173: 99-107.
259. **Walker, E. J. and R. Ghildyal** (2017). "Editorial: Viral Interactions with the Nucleus." *Front Microbiol* 8: 951.
260. **Walter, C. T. and J. N. Barr** (2011). "Recent advances in the molecular and cellular biology of bunyaviruses." *J Gen Virol* 92(Pt 11): 2467-2484.
261. **Walter, C.T., Bento, D.F., Alonso, A.G. and Barr, J.N.** (2011). "Amino acid changes within the Bunyamwera virus nucleocapsid protein differentially affect the mRNA transcription and RNA replication activities of assembled ribonucleoprotein templates". *J Gen Virol* 92: 80-84.
262. **Watts, D. M., S. Pantuwatana, G. R. DeFoliart, T. M. Yuill and W. H. Thompson** (1973). "Transovarial transmission of LaCrosse virus (California encephalitis group) in the mosquito, *Aedes triseriatus*." *Science* 182(4117): 1140-1141.
263. **Weaver, S. C. and W. K. Reisen** (2010). "Present and future arboviral threats." *Antiviral Res* 85(2): 328-345.

-
264. **Weber, F., E. F. Dunn, A. Bridgen and R. M. Elliott** (2001). "The Bunyamwera virus nonstructural protein NSs inhibits viral RNA synthesis in a minireplicon system." *Virology* 281(1): 67-74.
265. **Whelan, S.** (2013). "Viral replication strategies". In *Fields virology*, 6th. edn. Knipe, D.M., & Howley, P.M. (eds). Philadelphia: Lippincott Williams & Walker, pp. 105–126.
266. **Wileman, T.** (2006). "Aggresomes and autophagy generate sites for virus replication." *Science* 312(5775): 875-878.
267. **Willis, R. C., D. A. Carson and J. E. Seegmiller** (1978). "Adenosine kinase initiates the major route of ribavirin activation in a cultured human cell line." *Proc Natl Acad Sci U S A* 75(7): 3042-3044.
268. **Wyde, P. R., H. R. Six, S. Z. Wilson, B. E. Gilbert and V. Knight** (1988). "Activity against rhinoviruses, toxicity, and delivery in aerosol of enviroxime in liposomes." *Antimicrob Agents Chemother* 32(6): 890-895.
269. **Xiang, D., Y. Zheng, W. Duan, X. Li, J. Yin, S. Shigdar, M. L. O'Connor, M. Marappan, X. Zhao, Y. Miao, B. Xiang and C. Zheng** (2013). "Inhibition of A/Human/Hubei/3/2005 (H3N2) influenza virus infection by silver nanoparticles in vitro and in vivo." *Int J Nanomedicine* 8: 4103-4113.
270. **Xu, Z., M. Kuang, J. R. Okicki, H. Cramer and N. Chaudhary** (2004). "Potent inhibition of respiratory syncytial virus by combination treatment with 2-5A antisense and ribavirin." *Antiviral Res* 61(3): 195-206.
271. **Yadani, F. Z., A. Kohl, C. Prehaud, A. Billecocq and M. Bouloy** (1999). "The carboxy-terminal acidic domain of Rift Valley Fever virus NSs protein is essential for the formation of filamentous structures but not for the nuclear localization of the protein." *J Virol* 73(6): 5018-5025.
272. **Yamamoto, T., K. Kuniki, Y. Takekuma, T. Hirano, K. Iseki and M. Sugawara** (2007). "Ribavirin uptake by cultured human choriocarcinoma (BeWo) cells and *Xenopus laevis* oocytes expressing recombinant plasma membrane human nucleoside transporters." *Eur J Pharmacol* 557(1): 1-8.
273. **Yandoko N.E., S. Grimaldo, C. Finance, A. Le Faou, and B. H. Rihn** (2007). "Molecular characterization of African orthobunyaviruses." *J Gen Virol*. 88, 1764-1766.
274. **Yen, H. J., S. H. Hsu and C. L. Tsai** (2009). "Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes." *Small* 5(13): 1553-1561.
275. **Younossi, Z. M., M. Stepanova, M. Estep, F. Negro, P. J. Clark, S. Hunt, Q. Song, M. Paulson, L. M. Stamm, D. M. Brainard, G. M. Subramanian, J. G. McHutchison and K. Patel** (2016). "Dysregulation of distal cholesterol biosynthesis in association with relapse and advanced disease in CHC genotype 2 and 3 treated with sofosbuvir and ribavirin." *J Hepatol* 64(1): 29-36.
276. **Zeisel, M. B., J. Lupberger, I. Fofana and T. F. Baumert** (2013). "Host-targeting agents for prevention and treatment of chronic hepatitis C - perspectives and challenges." *J Hepatol* 58(2): 375-384.
277. **Zhang, T., L. Wang, Q. Chen and C. Chen** (2014). "Cytotoxic potential of silver nanoparticles." *Yonsei Med J* 55(2): 283-291.
278. **Zhou, Z., M. M. Mogensen, P. P. Powell, S. Curry and T. Wileman** (2013). "Foot-and-mouth disease virus 3C protease induces fragmentation of the Golgi compartment and blocks intra-Golgi transport." *J Virol* 87(21): 11721-11729.
279. **Zhu, B., Y. Li, Z. Lin, M. Zhao, T. Xu, C. Wang and N. Deng** (2016). "Silver Nanoparticles Induce HePG-2 Cells Apoptosis Through ROS-Mediated Signaling Pathways." *Nanoscale Res Lett* 11(1): 198.
-

280. **Zimmerman, T. P. and R. D. Deeptose** (1978). "Metabolism of 5-amino-1-beta-D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide and related five-membered heterocycles to 5'-triphosphates in human blood and L5178Y cells." *Biochem Pharmacol* 27(5): 709-716.
281. **Zulkifli, F. H., F. S. J. Hussain, S. S. Zeyohannes, M. Rasad and M. M. Yusuff** (2017). "A facile synthesis method of hydroxyethyl cellulose-silver nanoparticle scaffolds for skin tissue engineering applications." *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 79: 151-160.

Anexos



Drug repurposing for new, efficient, broad spectrum antivirals

Moisés García-Serradilla, Cristina Risco*, Beatriz Pacheco*,¹

Cell Structure Laboratory, National Center for Biotechnology, National Research Council, CNB-CSIC, Darwin 3, UAM, campus de Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Virus
Antivirals
Drug repurposing

ABSTRACT

Emerging viruses are a major threat to human health. Recent outbreaks have emphasized the urgent need for new antiviral treatments. For several pathogenic viruses, considerable efforts have focused on vaccine development. However, during epidemics infected individuals need to be treated urgently. High-throughput screening of clinically tested compounds provides a rapid means to identify undiscovered, antiviral functions for well-characterized therapeutics. Repurposed drugs can bypass part of the early cost and time needed for validation and authorization. In this review we describe recent efforts to find broad spectrum antivirals through drug repurposing. We have chosen several candidates and propose strategies to understand their mechanism of action and to determine how resistance to antivirals develops in infected cells.

1. Introduction

Viruses are a constant threat to humans, animals and plants. There are hundreds of viruses that can cause disease in humans but there is no treatment for most of them. Emerging or reemerging viruses are a public health concern (Howard and Fletcher, 2012). Some of these pathogens are the Rift Valley fever virus (RVFV), dengue virus (DENV), West Nile virus (WNV), yellow fever virus (YFV), Ebola virus (EBOV), SARS- and MERS-CoV, zika virus (ZIKV), Crimean Congo hemorrhagic fever virus (CCHFV), severe fever with thrombocytopenia syndrome virus (SFTSV), chikungunya virus (CHIKV) and influenza A virus (IAV). Recent outbreaks of these viruses are summarized in Table 1. International travel and migrations, globalization of commerce, technology and industry, agriculture development or climate changes are favoring the emergence and reemergence of viruses that could easily spread and potentially become a pandemic (Jones et al., 2008). A clear example of the potential of an emerging virus to become a pandemic is the emergence of human immunodeficiency virus (HIV) in the 1980s (<http://aidsinfo.unaids.org/>) (Sharp and Hahn, 2011). There is no cure for HIV, although antiretroviral treatment can control the virus (Barre-Sinoussi et al., 2013). In the case of influenza virus there are both vaccines and antiviral drugs. However, these viruses constantly change and antiviral resistance emerges (To et al., 2015). In 2013, human infections with a new avian influenza virus in China caused considerable concern due to the pandemic potential of this virus (Su et al., 2015). The experts consider that the virus could gain the ability to spread among people,

triggering a global epidemic (Su et al., 2015; Tanner et al., 2015).

Due to all these reasons, we urgently need new, efficient, broad-spectrum antivirals (Howard and Fletcher, 2012; Schor and Einav, 2018). The traditional strategy in drug development of one virus one drug, based in the development of molecules that specifically target a viral protein, has been very successful for certain viruses like HIV or hepatitis C virus (HCV) (Barre-Sinoussi et al., 2013; Li and De Clercq, 2017). In fact, most approved antiviral treatments target a viral protein, and thus are usually quite virus specific. However, direct acting antivirals (DAA) have some drawbacks.

The development of new therapeutic compounds is time and resources consuming (DiMasi et al., 2016). The whole process from the discovery of a new drug that can potentially treat a specific disease or condition to its approval to be used in humans can take several years (on average 12 to 16 years) (Nosengo, 2016). The first stage, drug discovery, can take between 3 to 6 years. Then preclinical studies, usually in animal models, are carried out. These studies that are aimed to test the efficiency and safety of a molecule in a suitable model before it is tested in humans can go on for about 3 years. If a molecule has shown promising results up to here, then clinical trials in humans are started. These trials, from phase I to phase III, usually last about 5 years. Finally, if a molecule successfully passes all the process it needs to get the approval from the appropriate agency. At the end it is estimated that only about 5% of the candidate molecules successfully pass the whole process. Adding to this the cost of drug development, about 1–2 billion dollars or more in some cases (DiMasi et al., 2016), the one virus

* Corresponding authors.

E-mail addresses: crisco@cnb.csic.es (C. Risco), bpache01@ucm.es (B. Pacheco).

¹ Present address: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramon y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain.

<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.02.011>

Received 21 November 2018; Received in revised form 18 February 2019; Accepted 18 February 2019

Available online 19 February 2019

0168-1702/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

Table 1
Recent outbreaks of pathogenic human viruses.
Sources: European Centre for Disease Prevention and Control. ECDC. (<https://ecdc.europa.eu/en/threats-and-outbreaks>) U.S. Centers for Disease Control and Protection. CDC. (<https://www.cdc.gov/outbreaks/index.html>) Chinese Center for Disease Control and Prevention (China CDC). (http://www.chinacdc.cn/en/aboutus/orc_9362/201810/t20181008_194504.html) World Health Organization (WHO). (<https://www.who.int/csr/don/en/>).

Virus	Year	Number of cases	Country/Territory	Total number of territories
Zika virus	(2013–2018)	> 220,000	Americas, Africa, Asia	85
Rift Valley fever virus (RVFV)	(2013–2018)	> 1,000	Africa, Saudi Arabia and Yemen	31
Ebola virus	(2014–2018)	> 28,900	West Africa (Liberia, Guinea, Sierra Leone, Nigeria, and Mali)	6
Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS)	(2012–2017)	> 2,200	Middle East, North Africa, Europe, the United States of America, and Asia	27
Severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV)	(2002–2003)	> 8,000	North America, South America, South Africa, Europe, and Asia	30
Influenza virus	Annual epidemics	3 to 5 million cases per year	Worldwide	
Chikungunya virus (CHIKV)	(2013–2018)	> 2 million	Americas, Africa, Asia, Europe, the Indian subcontinent and Pacific Islands in Oceania	112
Dengue virus	Annual epidemics	390 million dengue infections per year	Africa, the Americas, the Eastern Mediterranean, South-East Asia and the Western Pacific.	111
Yellow fever virus (YFV)	(2013–2018)	> 15,000	33 countries in Africa and 11 countries in South America	44
West Nile virus (WNV)	(2013–2018)	> 12,000 Since 2013: Around 2500 cases per year	North and South America, Europe, Africa, the Middle East, and West Asia and Oceania	83
Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (CCHFV)	(2000–2015)	> 1,000	Africa, Asia, Eastern and Southern Europe and Central Asia	42
Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus (SFTSV)	(2009–2016)	> 1300 Since 2016: > 1500 cases per year	South Korea, Japan, China and United Arab Emirates	4

one drug strategy is not the most cost efficient approach. In addition, the use of DAAs can easily lead to the appearance of drug resistant viruses due to the elevated mutation rate of viruses (Iyidogan and Anderson, 2014; Menendez-Arias et al., 2014; Perales et al., 2015).

To circumvent these limitations other strategies aim to develop molecules that target host cellular factors that are needed for viral replication. Although viruses can also find ways to use alternative routes to replicate in a host, emergence of resistant viruses is less likely (Lin and Galloway, 2013; Zeisel et al., 2013). In addition these approaches focused in host cellular pathways needed for viral replication can favor the development of broad spectrum antivirals. There are families of viruses that share certain cellular pathways. Thus, drugs that inhibit a specific cellular target could work for several viruses. As a drawback drugs that inhibit a host cell target have higher chances of producing undesirable side effects in the patient compared to drugs that target a viral protein.

Drug repurposing or repositioning is an alternative approach that can lead to less costly and faster approval of new treatments for viral infections (Mercorelli et al., 2018). A clear advantage of drug repositioning over traditional drug development is that since the repositioned drug has already passed a significant number of tests, its safety is known and the risk of failure is reduced. Although repositioned drugs can most likely skip phase I clinical trials, they still need to go through phase II and III trials to test their efficacy for the new condition (Nosengo, 2016). In some instances these drugs might have lost their patents, as is the case of generic medicines. In these cases, when a new formulation or a new medical use exists for an “old” drug, second medical use patents can be obtained for them. On the other hand, increasing implication of practicing physicians and researchers at academic centers in clinical trials can also help in the repurposing of these drugs (Nosengo, 2016). Additionally, there are thousands of drugs that have already passed clinical trials that confirm their safe use in humans. However, for some reasons, they lack or have poor efficiency to treat the condition under scrutiny and have not reached the market. These collections of drugs are another source of potential antivirals. Several drugs in the market have been tested for their potential use as broad spectrum antiviral treatments (Table 2). Many of these compounds have shown promising results in preclinical studies. Below we summarize the main results and antiviral mechanisms of selected candidates for repositioning as broad spectrum antiviral drugs.

2. Digoxin and other cardiac glycosides

Digoxin is a cardiac glycoside or cardiotonic steroid that has been used for treating certain heart conditions including heart failure, atrial fibrillation, atrial flutter, and paroxysmal atrial tachycardia (Gheorghiade et al., 2006). Cardiac glycosides comprise a large family of natural compounds that share a common steroid structure. Digoxin was first isolated from foxglove plant, *digitalis lanata*, in 1930, although foxglove plant extracts have been used from ancient times to treat heart conditions (Gheorghiade et al., 2006). Digoxin has been shown to block the Na^+/K^+ ATPase, raising intracellular Na^+ levels. The increase in intracellular Na^+ leads to an increment in intracellular Ca^{2+} due to inhibition of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger. Elevated intracellular Ca^{2+} ultimately leads to an increased contractibility of the cardiac muscle (Smith, 1988). Inhibition of the Na^+/K^+ ATPase has been shown to have an effect in multiple signaling cascades through modulation of neighboring tyrosine kinases, including src, ultimately affecting gene expression (Nesher et al., 2007). Thus, cardiac glycosides are in the spotlight for drug repurposing.

Some studies have shown the potential use of digoxin and other cardiac glycosides to treat cancer (Prassas and Diamandis, 2008). Cardiac glycosides can induce apoptosis in diverse cancer cells by multiple mechanisms including inhibition of Na^+/K^+ ATPase, suppression of nuclear factor-kappaB and inhibition of topoisomerase II (Ishida et al., 2016; Vaklavas et al., 2011). By performing a chemical screen with an

Table 2
Drug repurposing in antiviral discovery: Promising candidates.

Drug	Approved indication	Viruses targeted	IC50	References
Digoxin and derivatives	Heart conditions	HIV-1	45nM	(Laird et al., 2014; Wong et al., 2013)
		HSV, HCMV	0.5 µM 0.02 µM	(Dodson et al., 2007; Hartley et al., 2006; Kapoor et al., 2012)
		huAdV	NR	(Grosso et al., 2017)
		HBV	> 100 nM	(Okuyama-Dobashi et al., 2015)
		CHIKV	48.8 nM	(Ashbrook et al., 2016)
Chloroquine	Malaria	MERS-CoV	NR	(Burkard et al., 2015)
		CHIKV	50 nM	(Sourisseau et al., 2007)
		DENV	2.9–3.6 µM	(Boonyasuppayakorn et al., 2014; Farias et al., 2014)
		SARS- and MERS-CoV	4.1 µM 3 µM	(Keyaerts et al., 2004)
		Influenza virus	3.6 µM	(Di Trani et al., 2007; Ooi et al., 2006; Yan et al., 2013)
		CCHFV	28–43 µM	(Ferraris et al., 2015)
		ZIKV	9.8–14.2 µM	(Delvecchio et al., 2016; Li et al., 2017; Shiryayev et al., 2017)
		HIV-1	1–10 µM	(Sperber et al., 1993; Tsai et al., 1990)
		HAV	NR	(Bishop, 1998)
		EBOV	4.7–16 µM	(Madrid et al., 2013)
Cyclosporin A	Immune suppressive therapy	HIV-1	2.5 µM	(Franke et al., 1994; Thali et al., 1994; Wainberg et al., 1988)
		HBV	NR	(Watashi et al., 2014)
		HPV	2 µM	(Bienkowska-Haba et al., 2009)
		HCV	0.5 µM	(Kaul et al., 2009; Nakagawa et al., 2004; Yang et al., 2008)
		VSV	NR	(Bose et al., 2003)
		VV	NR	(Damaso and Moussatche, 1998)
		Influenza A virus	1.5–1.8 µM	(Hamamoto et al., 2013; Li et al., 2016; Liu et al., 2009, 2012a; Liu et al., 2012b; Ma et al., 2016; Schiltknecht and Ada, 1985)
		SARS-CoV	2.1–3.1 µM	(de Wilde et al., 2011; Pfefferle et al., 2011)
		HCV	0.04–0.2 µM	(Bekerman et al., 2017; Neveu et al., 2012, 2015)
		HIV	NR	(Guo et al., 2013)
Sunitinib and other tyrosine kinase inhibitors	Cancer	HCMV	9.05–10.3 µM	(Cai et al., 2014)
		DENV	NR	(Bekerman et al., 2017)
		EBOV	NR	(Bekerman et al., 2017)
		HSV	NR	(Baram-Pinto et al., 2009)
		Influenza virus	NR	(Papp et al., 2010; Xiang et al., 2013, 2011)
Silver nanoparticles	Antibacterial	HBV	NR	(Lu et al., 2008)
		HIV-1	0.44–0.91 mg/mL	(Elechiguerra et al., 2005; Lara et al., 2010a, b; Sun et al., 2005)
		RVFV	NR	(Borrego et al., 2016)
		DENV	NR	(Murugan et al., 2016; Sujitha et al., 2015)
		Tacaribe virus	NR	(Speshock et al., 2010)
Mycophenolic acid	Antibacterial	HIV	0.1–0.5 µM	(Chapuis et al., 2000; Kaur et al., 2005; Margolis et al., 1999)
		HCV	10.4 µM	(Henry et al., 2006; Pan et al., 2012)
		ZIKV	0.1–1 µM	(Barrows et al., 2016)
		DENV, WNV, YFV	0.4 µM 0.9 µg/mL NR	(Diamond et al., 2002; Takhampunya et al., 2006)
Minocycline	Antibacterial	HIV	40 µg/mL	(Lemaitre et al., 1990; Szeto et al., 2010; Zink et al., 2005)
		WNV	8.1–11.2 µg/mL	(Michaelis et al., 2007)
		DENV	NR	(Lai et al., 2018; Leela et al., 2016)
		JEV	NR	(Mishra and Basu, 2008)
		CCHFV	10.8–15.7 µM	(Ferraris et al., 2015)
Chlorpromazine hydrochloride	Antipsychotic	MERS- and SARS-CoV	4.9 µM 8.8 µM	(de Wilde et al., 2014; Dyllal et al., 2014)
Diphenoxilate	Anti-peristaltic	EBOV, LASV, MARV	50 µM NR NR	(Madrid et al., 2013)

Abbreviations: CCHFV Crimean Congo hemorrhagic fever virus; CHIKV chikungunya virus; HCMV human cytomegalovirus; DENV dengue virus; EBOV Ebola virus; HAV hepatitis A virus; HBV hepatitis B virus; HCV hepatitis C Virus; HIV human immunodeficiency virus; HPV human papilloma virus; HSV herpes simplex virus; huAdV human adenovirus; JEV japanesse encephalitis virus; LASV Lassa virus; MARV Marburg virus; MERS-CoV Middle East respiratory syndrome coronavirus; RVFV Rift Valley fever virus; SARS-CoV severe acute respiratory syndrome coronavirus; VSV vesicular stomatitis virus; VV vaccinia virus; WNV West Nile virus; YFV yellow fever virus; ZIKV zika virus.

insect cell-based reporter system, the cardiac glycoside digoxin was identified as a specific inhibitor of the retinoic acid receptor-related orphan nuclear receptor (ROR γ t) transcriptional activity (Huh et al., 2011), which is required for induction of IL-17 transcription and for the manifestation of T_H17-dependent autoimmune disease in mice. This study indicated that digoxin and its derivatives could be used as therapeutic agents that attenuate inflammatory lymphocyte function and autoimmune disease.

Recent studies have shown that digoxin and other cardiac glycosides can have a potential use as antivirals. Wong and colleagues reported the suppression of HIV-1 replication by digoxin (Wong et al., 2013). Digoxin was shown to accomplish its antiretroviral effects by two mechanisms: 1) inducing oversplicing of HIV-1 RNA which reduces the

accumulation of viral RNAs encoding for structural proteins needed for new virion assembly, and 2) selectively inhibiting the expression of HIV-1 regulatory protein Rev. These studies showed that digoxin exerted its anti-HIV effect by altering the function of a subset of SR proteins, a conserved family of serine and arginine-rich proteins involved in RNA splicing. A screening of a drug library for compounds inhibiting late steps of HIV-1 replication cycle also identified several members of the cardiac glycoside family (Laird et al., 2014).

The cardiac glycosides digoxin and ouabain have also been shown to impair replication of human cytomegalovirus (HCMV) and herpes simplex virus (HSV) that belong to the family of dsDNA viruses *Herpesviridae* (Dodson et al., 2007; Hartley et al., 2006; Kapoor et al., 2012). Inhibition happens at an early post-entry step and produces a

decrease in the expression of immediate-early proteins IE1 and IE2. Similarly, digoxin and digitoxin have been reported to suppress replication of human adenovirus (HAdV), another dsDNA virus, in cell cultures (Grosso et al., 2017). Although the precise mechanism of action is not fully clear, these drugs altered viral mRNA processing, blocking replication before viral DNA synthesis.

Some cardiac glycosides like procillaridin A, bufallin, covallatoxin and digitoxin are able to inhibit hepatitis B virus (HBV) in cell cultures (Okuyama-Dobashi et al., 2015). In this study, however, digoxin did not show an anti-HBV effect. Digoxin also inhibits alphaviruses (single-strand positive-sense RNA viruses) like chikungunya, Ross River virus and Sindbis virus, as well as the unrelated mammalian orthoreovirus (polysegmented double-strand RNA virus) and vesicular stomatitis virus from the *Rhabdoviridae* family (negative-sense RNA virus) (Ashbrook et al., 2016). In this study digoxin was shown to impair chikungunya infection at an early post-entry step.

Some coronaviruses like feline infectious peritonitis virus, murine hepatitis virus, and MERS-CoV are inhibited by ouabain and bufalin (Burkard et al., 2015). The antiviral effect of these cardiac glycosides was observed only when the drug was added prior to infection. Infection was not affected when the drugs were added 2 h post-infection, suggesting that for these viruses the drugs were acting during the entry step.

3. Sunitinib and other tyrosine kinase inhibitors

Sunitinib is a small molecule that inhibits multiple tyrosine kinase receptors like vascular endothelial growth factor receptor VEGFR, platelet-derived growth factor receptors PDGFR α and PDGFR β , fibroblast growth factor receptor 1, and epidermal growth factor receptor (Mendel et al., 2003; Sun et al., 2003). Sunitinib has been approved by the FDA for the treatment of some cancers (Atkins et al., 2006).

Recent studies have shown that sunitinib may also have broad spectrum antiviral activity. Intracellular trafficking of viruses relies on the endocytic and exocytic cellular pathways. These processes usually require signal transduction, suggesting that kinase inhibitors may have antiviral activity by blocking the endocytic or exocytic pathways. Binding of the HCV core protein to adaptor protein 2 (AP-2) μ 2 subunit (AP2M1) is essential for HCV assembly. Phosphorylation of AP2 by adaptor associated kinase (AKK1) and cycling G-associated kinase (GAK) regulate this interaction (Neveu et al., 2012, 2015). It has also been shown that AP1 and AP2 co-traffic with HCV viral particles within the cell (Bekerman et al., 2017). These studies showed that sunitinib prevents HCV entry and assembly, apparently through an inhibitory effect on AAK1 and GAK, with no effect on HCV RNA replication. Erlotinib, another anticancer drug, also inhibits HCV entry and assembly. Similarly, sunitinib and/or erlotinib can restrict infection by DENV and EBOV *in vitro* and in a murine animal model and have potent *in vitro* antiviral activity against ZIKV, WNV, CHIKV, Junin virus (JUNV) and respiratory syncytial virus (RSV) (Bekerman et al., 2017; Pu et al., 2018). Sunitinib has also been shown to inhibit HCMV infection in cell culture (Cai et al., 2014) and HIV-1 infection of resting CD4 T cells (Guo et al., 2013).

Although these studies showed the potential antiviral activity of sunitinib, this drug can also inhibit protein kinase R (PKR) and 2'5'oligoadenylate synthetase (OAS)/RNase L system that act as antiviral effectors in response to type I interferons (Jha et al., 2013). The capacity of sunitinib to block these two innate immunity pathways could hamper its potential use as antiviral. The development of more selective GAK inhibitors could bypass this hurdle. In this sense, a screening of a library based on a bicyclic, heteroaromatic flat scaffold designed to discover novel ligands of GAK, led to the identification of a hit compound based on a isothiazolo[4,3-*b*]pyridine scaffold (Kovackova et al., 2015). Some isothiazolo[4,3-*b*]pyridine derivatives with low nanomolar affinity for GAK exhibited inhibitory activity against HCV in cell culture, acting at the level of viral entry and

assembly (Kovackova et al., 2015).

4. Chloroquine and its analogs

Chloroquine (CQ) is a weak base 4-aminoquinolone derivative that can easily enter the cells and accumulate in acidic compartments like endosomes, lysosomes or trans-Golgi network vesicles raising their pH (Thome et al., 2013). In the clinic CQ has been used for the treatment of non-resistant malaria (Slater, 1993; White, 1996). Additionally CQ has been proven to have anti-inflammatory properties, and has been approved for the clinical management of some autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis and lupus erythematosus (Rainsford et al., 2015).

Many viruses use acidic organelles at some point of their replication cycle. This has prompted the study of CQ and its hydroxyl analogue hydroxychloroquine (HCQ) as potential antiviral drugs. CQ and HCQ have been tested and proved to have *in vitro*, and in some instances *in vivo*, antiviral activity against several viruses, as described below.

Two main mechanisms of action have been described for the antiviral activity of CQ (Al-Bari, 2017). On the one hand, many viruses use acidic endocytic vesicles, like endosomes or lysosomes, to enter the host cell. The acidification of these vesicles triggers conformational changes in the envelope proteins of the virus that induce the fusion of the viral and cellular membranes and the delivery of the virion content into the cell. CQ raises the pH of these vesicles impeding the conformational changes needed for viral entry or uncoating and blocking the infection. CQ has also been shown to impair maturation of some viral proteins in the Golgi network by blocking the action of pH-dependent enzymes, like proteases or glycosyltransferases, which are needed for the maturation process. The antiretroviral effect of CQ in cell cultures has been shown to occur through the inhibition of the glycosylation of HIV viral particles (Savarino et al., 2004), while the antiviral activity of CQ against SARS-CoV seems to be related to the poor glycosylation of the SARS-CoV receptor ACE2 (Vincent et al., 2005). CQ has been reported to inhibit DENV replication by blocking the cleavage of the prM protein that occurs in acidic compartments (Boonyasuppayakorn et al., 2014; Randolph et al., 1990).

CQ and some of its derivatives have been reported to have strong antiviral activity against SARS-CoV and MERS-CoV in different cell lines with IC₅₀ ranging from 3.0 to 8.8 μ M (de Wilde et al., 2014; Dyall et al., 2014; Keyaerts et al., 2004; Vincent et al., 2005). However, in a SARS-CoV mouse model CQ treatment did not reduce virus titer in the lungs (Barnard et al., 2006).

Some studies have reported inhibitory effect of CQ against influenza A viruses (IAV) H3N2 and H1N1 *in vitro* at concentrations similar to doses used for malaria treatment (Ooi et al., 2006). However, the susceptibility of IAV to CQ seems to depend on the pH requirements of the viruses and the electrostatic potential of hemagglutinin 2 (Di Trani et al., 2007). In a mouse model of infection with IAV, CQ treatment dramatically increased the survival of infected mice when administered therapeutically but not when administered as a prophylactic treatment (Yan et al., 2013). Furthermore, a randomized, double-blinded placebo controlled clinical trial did not protect against influenza infection (Paton et al., 2011).

Dengue virus and WNV replication has also been reported to be blocked by CQ in cell culture (Boonyasuppayakorn et al., 2014; Farias et al., 2014). A recent study has demonstrated the efficacy of CQ in the prophylactic and therapeutic treatment of *Aotus* monkeys inoculated with DENV (Farias et al., 2015). However, a double-blinded, placebo-controlled clinical trial in Vietnam failed to show a beneficial impact of CQ treatment in the outcome of the infection except for a modest reduction in the percentage of patients that developed dengue hemorrhagic fever in the CQ-treated arm (Tricou et al., 2010). Chloroquine also exhibits antiviral activity against ZIKV, another member of the *Flaviviridae* family, in different cell lines with an IC₅₀ around 9.8–14.2 μ M (Delvecchio et al., 2016). Additionally, some studies have

demonstrated that chloroquine can protect mice against ZIKV infection (Li et al., 2017; Shiryayev et al., 2017).

CQ has also been reported to inhibit CHIKV in cell cultures in a dose dependent manner when added at an early point during infection (Sourisseau et al., 2007). Although in this study the therapeutic index of the drug in cell cultures was low, the results pointed at the potential use of CQ for the treatment of CHIKV infection. However, a clinical trial in the French Reunion Island during an outbreak of CHIKV to test the efficacy and safety of CQ treatment did not show evidence of a significant antiviral effect in CQ treated patients compared to placebo treated patients (De Lamballerie et al., 2008). This lack of antiviral effect could be due to the high viral load in the serum of patients during the acute phase of the infection. The rather narrow therapeutic index of CQ leaves little room for a dose adjustment that could allow the use of CQ as a therapeutic treatment in acute chikungunya infection. Nonetheless, in cell cultures, where the viral titer is lower, CQ strongly inhibits CHIKV infection at concentrations achieved in plasma of individuals on CQ treatment for malaria, which suggest that CQ could be used as a prophylactic treatment during chikungunya outbreaks to prevent transmission (Khan et al., 2010). However, a recent study in non-human primates showed that chloroquine treatment exacerbated the disease and/or suppressed the antiviral immunity in the chloroquine treated macaques compared to the placebo group (Roques et al., 2018).

CQ and HCQ were both shown to inhibit HIV replication in monocytic and T cell lines as well as in monocytes and primary T cells at a post-transcriptional step (Sperber et al., 1993; Tsai et al., 1990). CQ can also inhibit other viruses like CCHFV (Ferraris et al., 2015), hepatitis A virus (HAV) (Bishop, 1998) and EBOV (Madrid et al., 2013) in cell lines. Additionally, CQ has been shown to protect mice against a challenge of a deadly dose of EBOV (Madrid et al., 2013).

In cell culture CQ has shown potent antiviral activity against a broad range of viruses and in some cases efficacy in animal model of infection, as discussed above. However, clinical trials aimed to test the efficacy of CQ as antiviral has shown very limited antiviral effect. The rather narrow therapeutic index of chloroquine might be behind the limited antiviral effect of chloroquine in clinical trials. The development of chloroquine derivatives with lower toxicity could improve their effectiveness for the treatment of viral infections. The immunomodulatory activity of CQ can also contribute to the control of viral diseases reducing the excessive release of cytokines and other pro-inflammatory mediators.

5. Cyclosporin A and its derivatives

Cyclophilin A (CypA) is a peptidylprolyl isomerase that is expressed in the cytosol (Schmid, 1995). Cyclosporin A (CsA) is a cyclic undecapeptide with immune suppressive activity that mainly targets cellular cyclophilins (CyPs) (Handschumacher et al., 1984; Schreiber, 1991). The Cyp-CsA complex inhibits the phosphatase activity of calcineurin needed for the nuclear translocation of the nuclear factor of activated T cells (NFAT), which eventually leads to the block of transcription of cytokines and inhibition of T cell activation (Matsuda and Koyasu, 2000). CsA is one of the drugs approved by the FDA for immunosuppressive therapy to avoid rejection in organ transplants (Hartono et al., 2013).

CsA has been reported to have antiviral activity against a wide range of viruses including human papilloma virus (HPV) (Bienkowska-Haba et al., 2009), vesicular stomatitis virus (VSV) (Bose et al., 2003), vaccinia virus (VV) (Damaso and Moussatche, 1998), HIV-1 (Franke et al., 1994; Thali et al., 1994; Wainberg et al., 1988), and HCV (Kaul et al., 2009; Nakagawa et al., 2004; Yang et al., 2008). Although the immunosuppressive activity of CsA does not make it a good candidate for antiviral treatment, some CsA derivatives, like alisporivir, NIM811 and SCY-635, with reduced immunosuppressive properties that retain the ability to bind cyclophilin have been developed and proved to

conserve the antiviral activity (Flisiak et al., 2008; Ma et al., 2016; Paeshuyse et al., 2006; Watashi et al., 2014). The replication of certain viruses like HIV, HCV, HPV, VSV, VV or influenza virus relies on their interaction with cyclophilins at certain steps of their replication cycle. Thus, the antiviral activity of cyclosporine A (CsA) and some of its non-immunosuppressive analogs against these viruses has been shown to be related to its ability to bind cellular cyclophilins and inhibiting the interaction with the viral proteins (Bienkowska-Haba et al., 2009; Bose et al., 2003; Damaso and Moussatche, 1998; Franke et al., 1994; Kaul et al., 2009; Nakagawa et al., 2004; Thali et al., 1994; Wainberg et al., 1988; Yang et al., 2008).

CsA also blocks the replication of diverse coronaviruses (de Wilde et al., 2018, 2011; Pfefferle et al., 2011). The nucleocapsid protein of SARS-CoV specifically binds CypA (Luo et al., 2004), and CypA has been found to be incorporated into the SARS-CoV particle (Neuman et al., 2008). However, siRNA knock-down of cellular CypA and CypB, the main targets of CsA, did not have an effect in the infectivity of this virus, suggesting that either these cyclophilins are not required for viral replication or that the remaining levels of cellular cyclophilins are enough to support normal replication (de Wilde et al., 2011).

Additionally CsA and some CsA analogs have been shown to inhibit HBV entry into cells (Watashi et al., 2014). However, this inhibitory activity was independent on the binding to CypA or calcineurin, and correlated to the ability of CsA to inhibit the transporter activity of sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP), a membrane protein that has been proposed to be the HBV receptor.

CypA has been reported to interact with influenza A virus matrix protein M1 suppressing viral replication in cell cultures and animal models (Li et al., 2016; Liu et al., 2009). The role of CypA in the viral cycle is unclear. Although it seems to act at several steps of the viral life cycle, the isomerase activity of CypA does not seem to be implicated (Liu et al., 2009). Overexpression of CypA inhibits M1 translocation into the nucleus (Liu et al., 2009) while depletion of CypA accelerated the replication of the virus (Liu et al., 2012b). Additionally CypA has been shown to increase degradation of M1 through the ubiquitin proteasome system (Liu et al., 2012b). The effect of CsA on influenza A virus infection has also been investigated. CsA-treated mice were administered a dose of influenza A virus that would be lethal for untreated mice, but they survived (Schiltknecht and Ada, 1985). CsA has also been reported to inhibit the propagation of several strains of influenza A virus in cell cultures blocking a late step of the replication cycle by mechanisms that might implicate CypA-dependent and -independent pathways (Hamamoto et al., 2013; Liu et al., 2012a; Ma et al., 2016).

Globally these results point at non-immunosuppressive CsA analogs as promising broad-spectrum antivirals. The most advanced CsA analogue is alisporivir or Debio 025 that has been evaluated in phase II and phase III clinical trials with HCV infected patients (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01215643 and NCT02753699) with promising results on their safety and efficacy. Further studies to evaluate the efficacy of CsA analogs with reduced immunosuppressive activity as antivirals in clinical trials are assured.

6. Silver nanoparticles

The antibacterial effect of silver metal has been known from ancient times (Barillo and Marx, 2014). Recent advances in nanotechnology have allowed the introduction of silver nanoparticles (AgNPs) for biomedical applications (Burdusel et al., 2018). AgNPs can be prepared by several techniques, including physical, chemical and biological methods. Depending on the size and the technique used to prepare the nanoparticles their properties and toxicity can vary (Thorley and Tetley, 2013; Ullah Khan et al., 2018).

AgNPs have been proven to have broad antimicrobial activity against Gram positive and Gram negative bacteria (Kim et al., 2007; Morones et al., 2005). In addition, some studies have shown that AgNPs also have antiviral activity against a broad range of viruses including

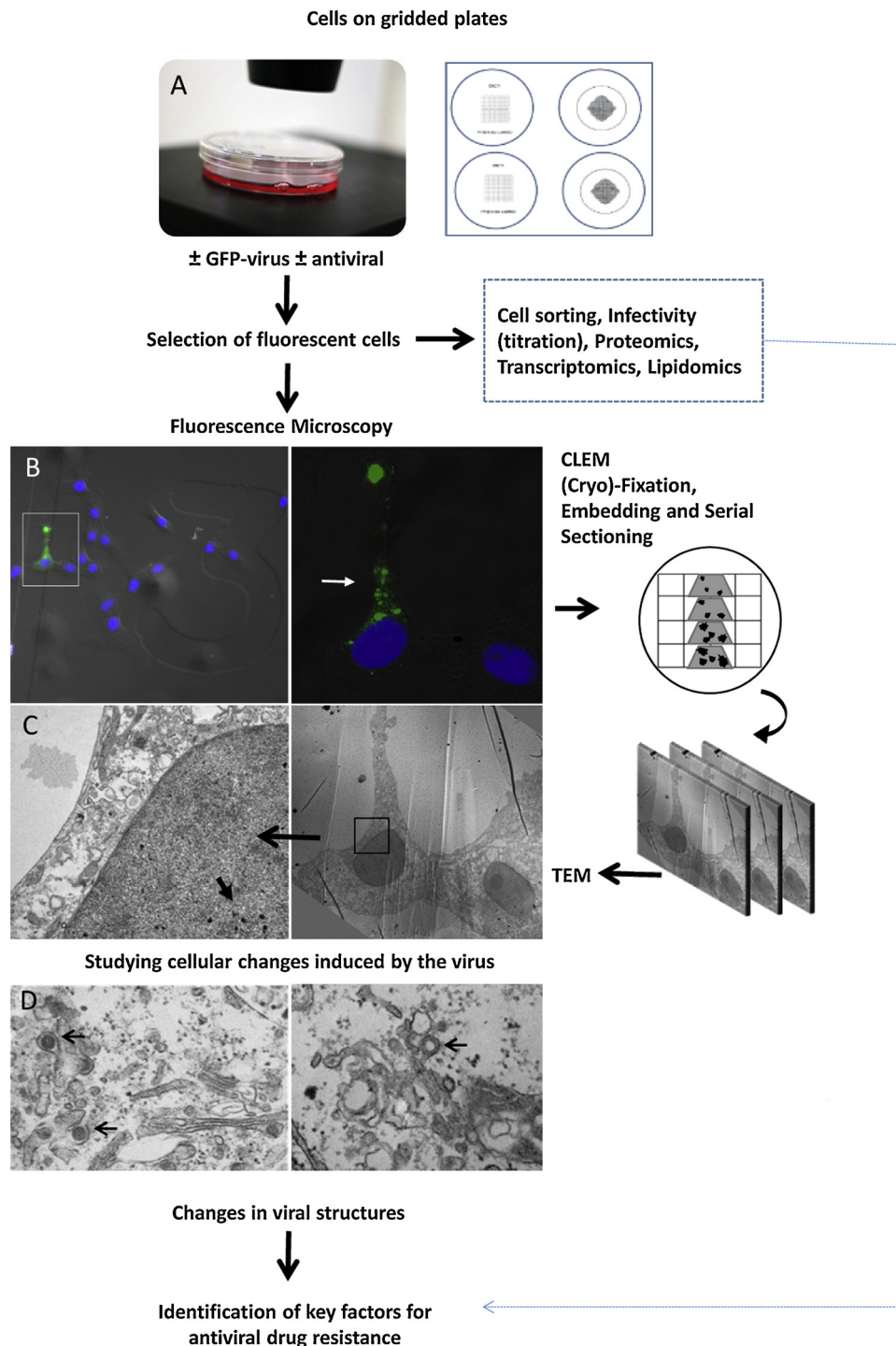


Fig. 1. Experimental strategy to study the mechanism of action of antiviral drugs in single cells and to investigate the origin of antiviral drug resistance.

herpes simplex virus (Baram-Pinto et al., 2009), influenza virus (Papp et al., 2010; Xiang et al., 2013, 2011), hepatitis B virus (Lu et al., 2008), HIV-1 (Elechiguerra et al., 2005; Lara et al., 2010a, b; Sun et al., 2005), Rift Valley fever virus (Borrego et al., 2016), dengue virus (Murugan et al., 2016; Sujitha et al., 2015) and Tacaribe virus (Speshock et al., 2010).

The antiviral mechanism of action of AgNPs is not well defined. AgNPs are thought to interfere with virus-cell attachment and entry into the target cell or by directly inducing structural changes in the virion turning it non-infective (Elechiguerra et al., 2005; Xiang et al., 2013). Additionally, AgNPs can enter the cell and exert their antiviral

activity by interfering with cellular proteins needed for viral replication or by direct interaction with viral proteins. Silver ions (Ag^+) can react with thiols and phosphate groups present on proteins and nucleic acids inhibiting different steps of the replication cycle (Lara et al., 2010a). AgNPs formulated as topical vaginal gels could be used to prevent the transmission of sexually transmitted infections like HIV and HSV. Studies in an *in vitro* system using human cervical tissue cultures that simulate *in vivo* conditions have shown encouraging results inhibiting HIV transmission (Lara et al., 2010b).

Although the use of AgNPs for biomedical applications seems promising, further studies are needed to better understand their potential

toxicity and long term effects on human health and in the environment. The toxicity of AgNPs is highly related to the release of Ag^+ , which directly depends on the size of the nanoparticles. The smaller the size the higher the amount of Ag^+ released. Ag^+ has been reported to alter mitochondrial function (Chappell and Greville, 1954; Kone et al., 1988). Moreover, exposure of cells to AgNPs induce the production of high levels of reactive oxygen species (ROS) and JNK and p53 activation leading to mitochondria-dependent cell apoptosis (Hsin et al., 2008). Therefore, further studies are needed to better understand the mode of action of AgNPs, their cell specificity and toxicological issues in order to generate new and more effective compounds as well as the use in combination with other drugs in the treatment of different viral diseases.

7. Imaging for studying antivirals

High Content Imaging (HCI) is a popular and basic tool of early drug discovery in multiple disease research areas (Carpenter, 2007). HCI was developed with the contribution of major advances in robotics, imaging and automated image processing (Moffat et al., 2017). HCI is already a fundamental technology for antiviral screening and validation (Bernatchez et al., 2018; Hoenen, 2017; Lowen et al., 2018; Mudhasani et al., 2014; Panchal et al., 2010; Tan et al., 2014).

Moreover, recent developments in light and electron microscopy are having a significant impact in virology. In particular, live-cell microscopy, super-resolution microscopy, correlative light and electron microscopy (CLEM) and 3D imaging are now fundamental tools for studying virus-cell interactions (Bykov et al., 2016; Fernandez de Castro et al., 2017; Francis and Melikyan, 2018; Risco et al., 2014; Witte et al., 2018). Microscopy is also a powerful tool for studying antivirals. With CLEM, scientists can study events at the level of single cells in culture (Fernandez de Castro et al., 2014; Hellstrom et al., 2015; Tenorio et al., 2018) and infected animals (Lowen et al., 2018). CLEM is starting to show its potential for testing antivirals because changes in viral structures assembled in cells where the treatment was effective and in those where the antiviral drug failed can be now studied in detail (Berger et al., 2014; Lowen et al., 2018; Martinez et al., 2014).

Cell sorting and CLEM in combination with proteomics, transcriptomics and lipidomics, will be exceptionally informative in identifying new targets for antiviral drugs, to characterize the mechanism of action of old and new antiviral compounds and to understand how resistance to antivirals is developed in cells (Fig. 1). The strategy for these studies can be as follows: Duplicated cell cultures infected with a fluorescent virus and treated in the presence or absence of an antiviral drug are processed either by CLEM or cell sorting. Fluorescence microscopy will reveal interesting features in single cells that are then processed for ultrastructural analysis. Electron microscopy will show how viral structures are affected by the antiviral drug. In parallel, key cell factors involved in cell resistance to infection or in viral escape to the antiviral drug will be identified by comparing fluorescent and non-fluorescent cells separated by cell sorting and studied by proteomics, transcriptomics and lipidomics. For these studies, cells that differentiate into tissues and 3D organoids (Liu et al., 2013; Takebe et al., 2015; Walters et al., 2013) will provide more physiologically relevant cellular systems to study virus infection and to test antivirals.

8. Conclusions and perspectives

Emerging viruses are a major threat to human health and the rate at which new pathogenic viruses are emerging has accelerated in the past fifty years. The frequent outbreaks have highlighted the urgent need for new antiviral treatments. Generally, antiviral drug development has focused on targeting viral components to block virus entry, replication, morphogenesis and propagation, or on the modulation of the host immune response (Zhu et al., 2015). Drug repurposing is an important alternative. In this review we have chosen several repurposed drugs

with proven antiviral activity. With different mechanisms of action, digoxin, sunitinib, chloroquine, cyclosporine A and silver nanoparticles are promising candidates for broad spectrum antivirals that could be used in a combined antiviral therapy. Drug repurposing is now facilitated by a number of resources (Pollastri and Campbell, 2011), such as pathogen target bioinformatics resources, public data repositories of screening data, structural biology resources and compound collections, such as the library of small molecules from the National Institutes of Health (<http://www.nihclinicalcollection.com>) (Ashbrook et al., 2016; Cao et al., 2015) or the Canadian DrugBank (<https://www.drugbank.ca/>), a large drug database commonly used by computational drug repositioning methods. DrugBank contains FDA approved drugs and those in clinical trials and is frequently updated with new information. With new and powerful screening assays and prediction tools, in silico structure-based screening of these large chemical libraries is identifying potential inhibitors of viral infections including repurposed compounds that target a variety of viral proteins and host factors (Abu Bakar and Ng, 2018; Barrows et al., 2016; Dowall et al., 2016; Martinez et al., 2015; Yuan et al., 2017). Another strategy that will surely reveal more promising candidates is based on comparing data from databases of pathogens (Brown and Patel, 2017; Sharma et al., 2015) with databases of drugs, e.g., drug information from the National Library of Medicine (<https://www.nlm.nih.gov/learn-about-drugs.html>). Imaging studies combined with functional assays will show the localization and intracellular effects of these new inhibitors (Panchal et al., 2010). Combination therapies with more than one drug against more than one target will be necessary to minimize problems of resistance to repurposed antiviral drugs.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was supported by a research grant from the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness (BIO2015-68758-R, MINECO-FEDER to CR). BP was recipient of a post-doctoral contract from the Severo Ochoa Center of Excellence Program.

References

- Abu Bakar, F., Ng, L.F.P., 2018. Nonstructural proteins of alphavirus-potential targets for drug development. *Viruses* 10.
- Al-Bari, M.A.A., 2017. Targeting endosomal acidification by chloroquine analogs as a promising strategy for the treatment of emerging viral diseases. *Pharmacol. Res. Perspect.* 5, e00293.
- Ashbrook, A.W., Lentscher, A.J., Zamora, P.F., Silva, L.A., May, N.A., Bauer, J.A., Morrison, T.E., Dermody, T.S., 2016. Antagonism of the sodium-potassium ATPase impairs Chikungunya virus infection. *MBio* 7.
- Atkins, M., Jones, C.A., Kirkpatrick, P., 2006. Sunitinib maleate. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 279–280.
- Baram-Pinto, D., Shukla, S., Perkash, N., Gedanken, A., Sarid, R., 2009. Inhibition of herpes simplex virus type 1 infection by silver nanoparticles capped with mercaptoethane sulfonate. *Bioconjug. Chem.* 20, 1497–1502.
- Barillo, D.J., Marx, D.E., 2014. Silver in medicine: a brief history BC 335 to present. *Burns* 40 (Suppl. 1), S3–S8.
- Barnard, D.L., Day, C.W., Bailey, K., Heiner, M., Montgomery, R., Lauridsen, L., Chan, P.K., Sidwell, R.W., 2006. Evaluation of immunomodulators, interferons and known in vitro SARS-CoV inhibitors for inhibition of SARS-CoV replication in BALB/c mice. *Antivir. Chem. Chemother.* 17, 275–284.
- Barre-Sinoussi, F., Ross, A.L., Delfraissy, J.F., 2013. Past, present and future: 30 years of HIV research. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 877–883.
- Barrows, N.J., Campos, R.K., Powell, S.T., Prasanth, K.R., Schott-Lerner, G., Soto-Acosta, R., Galarza-Munoz, G., McGrath, E.L., Urrabaz-Garza, R., Gao, J., Wu, P., Menon, R., Saade, G., Fernandez-Salas, I., Rossi, S.L., Vasilakis, N., Routh, A., Bradrick, S.S., Garcia-Blanco, M.A., 2016. A screen of FDA-Approved drugs for inhibitors of Zika virus infection. *Cell Host Microbe* 20, 259–270.
- Bekerman, E., Neveu, G., Shulla, A., Brannan, J., Pu, S.Y., Wang, S., Xiao, F., Barouch-Bentov, R., Bakken, R.R., Mateo, R., Govero, J., Nagamine, C.M., Diamond, M.S., De Jonghe, S., Herdewijn, P., Dye, J.M., Randall, G., Einav, S., 2017. Anticancer kinase inhibitors impair intracellular viral trafficking and exert broad-spectrum antiviral effects. *J. Clin. Invest.* 127, 1338–1352.

- Berger, C., Romero-Brey, I., Radujkovic, D., Terreur, R., Zayas, M., Paul, D., Harak, C., Hoppe, S., Gao, M., Penin, F., Lohmann, V., Bartenschlager, R., 2014. Daclatasvir-like inhibitors of NS5A block early biogenesis of hepatitis C virus-induced membranous replication factories, independent of RNA replication. *Gastroenterology* 147, 1094–1105 e1025.
- Bernatchez, J.A., Yang, Z., Coste, M., Li, J., Beck, S., Liu, Y., Clark, A.E., Zhu, Z., Luna, L.A., Sohl, C.D., Purse, B.W., Li, R., Siqueira-Neto, J.L., 2018. Development and validation of a phenotypic high-content imaging assay for assessing the antiviral activity of small-molecule inhibitors targeting zika virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* 62.
- Bienkowska-Haba, M., Patel, H.D., Sapp, M., 2009. Target cell cyclophilins facilitate human papillomavirus type 16 infection. *PLoS Pathog.* 5, e1000524.
- Bishop, N.E., 1998. Examination of potential inhibitors of hepatitis A virus uncoating. *Intervirology* 41, 261–271.
- Boonyasuppayakorn, S., Reichert, E.D., Manzano, M., Nagarajan, K., Padmanabhan, R., 2014. Amodiaquine, an antimalarial drug, inhibits dengue virus type 2 replication and infectivity. *Antiviral Res.* 106, 125–134.
- Borrego, B., Lorenzo, G., Mota-Morales, J.D., Almanza-Reyes, H., Mateos, F., Lopez-Gil, E., de la Losa, N., Burmistrov, V.A., Pestryakov, A.N., Brun, A., Bogdanchikova, N., 2016. Potential application of silver nanoparticles to control the infectivity of Rift Valley fever virus in vitro and in vivo. *Nanomedicine* 12, 1185–1192.
- Bose, S., Mathur, M., Bates, P., Joshi, N., Banerjee, A.K., 2003. Requirement for cyclophilin A for the replication of vesicular stomatitis virus New Jersey serotype. *J. Gen. Virol.* 84, 1687–1699.
- Brown, A.S., Patel, C.J., 2017. A standard database for drug repositioning. *Sci. Data* 4, 170029.
- Burdusel, A.C., Gherasim, O., Grumezescu, A.M., Mogoanta, L., Fica, A., Andronescu, E., 2018. Biomedical applications of silver nanoparticles: an up-to-date overview. *Nanomaterials (Basel)* 8.
- Burkard, C., Verheije, M.H., Haagmans, B.L., van Kuppeveld, F.J., Rottier, P.J., Bosch, B.J., de Haan, C.A., 2015. ATP1A1-mediated Src signaling inhibits coronavirus entry into host cells. *J. Virol.* 89, 4434–4448.
- Bykov, Y.S., Cortese, M., Briggs, J.A., Bartenschlager, R., 2016. Correlative light and electron microscopy methods for the study of virus-cell interactions. *FEBS Lett.* 590, 1877–1895.
- Cai, H., Kapoor, A., He, R., Venkatadri, R., Forman, M., Posner, G.H., Arav-Boger, R., 2014. In vitro combination of anti-cytomegalovirus compounds acting through different targets: role of the slope parameter and insights into mechanisms of Action. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 986–994.
- Cao, J., Forrest, J.C., Zhang, X., 2015. A screen of the NIH Clinical Collection small molecule library identifies potential anti-coronavirus drugs. *Antiviral Res.* 114, 1–10.
- Carpenter, A.E., 2007. Image-based chemical screening. *Nat. Chem. Biol.* 3, 461–465.
- Chappell, J.B., Greville, G.D., 1954. Effect of silver ions on mitochondrial adenosine triphosphatase. *Nature* 174, 930–931.
- Chapuis, A.G., Paolo Rizzardi, G., D'Agostino, C., Attinger, A., Knabenhans, C., Fleury, S., Acha-Orbea, H., Pantaleo, G., 2000. Effects of mycophenolic acid on human immunodeficiency virus infection in vitro and in vivo. *Nat. Med.* 6, 762–768.
- Damaso, C.R., Moussatche, N., 1998. Inhibition of vaccinia virus replication by cyclosporin A analogues correlates with their affinity for cellular cyclophilins. *J. Gen. Virol.* 79 (Pt 2), 339–346.
- De Lamballerie, X., Boisson, V., Reynier, J.C., Enault, S., Charrel, R.N., Flahault, A., Roques, P., Le Grand, R., 2008. On chikungunya acute infection and chloroquine treatment. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 8, 837–839.
- de Wilde, A.H., Zevenhoven-Dobbe, J.C., van der Meer, Y., Thiel, V., Narayanan, K., Makino, S., Snijder, E.J., van Hemert, M.J., 2011. Cyclosporin A inhibits the replication of diverse coronaviruses. *J. Gen. Virol.* 92, 2542–2548.
- de Wilde, A.H., Jochmans, D., Posthuma, C.C., Zevenhoven-Dobbe, J.C., van Nieuwkoop, S., Bestebroer, T.M., van den Hoogen, B.G., Neyts, J., Snijder, E.J., 2014. Screening of an FDA-approved compound library identifies four small-molecule inhibitors of Middle East respiratory syndrome coronavirus replication in cell culture. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 4875–4884.
- de Wilde, A.H., Pham, U., Posthuma, C.C., Snijder, E.J., 2018. Cyclophilins and cyclophilin inhibitors in nidovirus replication. *Virology* 522, 46–55.
- Delvechio, R., Higa, L.M., Pezzuto, P., Valadao, A.L., Garcez, P.P., Monteiro, F.L., Lioila, E.C., Dias, A.A., Silva, F.J., Aliota, M.T., Caine, E.A., Osorio, J.E., Bellio, M., O'Connor, D.H., Rehen, S., de Aguiar, R.S., Savarino, A., Campanati, L., Tanuri, A., 2016. Chloroquine, an endocytosis blocking agent, inhibits zika virus infection in different cell models. *Viruses* 8.
- Di Trani, L., Savarino, A., Campitelli, L., Norelli, S., Puzelli, S., D'Ostilio, D., Vignolo, E., Donatelli, I., Cassone, A., 2007. Different pH requirements are associated with divergent inhibitory effects of chloroquine on human and avian influenza A viruses. *Virol. J.* 4, 39.
- Diamond, M.S., Zachariah, M., Harris, E., 2002. Mycophenolic acid inhibits dengue virus infection by preventing replication of viral RNA. *Virology* 304, 211–221.
- DiMasi, J.A., Grabowski, H.G., Hansen, R.W., 2016. Innovation in the pharmaceutical industry: new estimates of R&D costs. *J. Health Econ.* 47, 20–33.
- Dodson, A.W., Taylor, T.J., Knipe, D.M., Coen, D.M., 2007. Inhibitors of the sodium potassium ATPase that impair herpes simplex virus replication identified via a chemical screening approach. *Virology* 366, 340–348.
- Dowall, S.D., Bewley, K., Watson, R.J., Vasan, S.S., Ghosh, C., Konai, M.M., Gausdal, G., Lorens, J.B., Long, J., Barclay, W., Garcia-Dorival, I., Hiscov, J., Bosworth, A., Taylor, I., Easterbrook, L., Pitman, J., Summers, S., Chan-Pensley, J., Funnell, S., Vipond, J., Charlton, S., Haldar, J., Hewson, R., Carroll, M.W., 2016. Antiviral screening of multiple compounds against ebola virus. *Viruses* 8.
- Dyall, J., Coleman, C.M., Hart, B.J., Venkataraman, T., Holbrook, M.R., Kindrachuk, J., Johnson, R.F., Olinger Jr., G.G., Jahrling, P.B., Laidlaw, M., Johansen, L.M., Lear-
- Rooney, C.M., Glass, P.J., Hensley, L.E., Frieman, M.B., 2014. Repurposing of clinically developed drugs for treatment of Middle East respiratory syndrome coronavirus infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 4885–4893.
- Elechiguerra, J.L., Burt, J.L., Morones, J.R., Camacho-Bragado, A., Gao, X., Lara, H.H., Yacamán, M.J., 2005. Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *J. Nanobiotechnol.* 3, 6.
- Farias, K.J., Machado, P.R., de Almeida Junior, R.F., de Aquino, A.A., da Fonseca, B.A., 2014. Chloroquine interferes with dengue-2 virus replication in U937 cells. *Microbiol. Immunol.* 58, 318–326.
- Farias, K.J., Machado, P.R., Muniz, J.A., Imbeloni, A.A., da Fonseca, B.A., 2015. Antiviral activity of chloroquine against dengue virus type 2 replication in Aotus monkeys. *Viral Immunol.* 28, 161–169.
- Fernandez de Castro, I., Sanz-Sanchez, L., Risco, C., 2014. Metallothioneins for correlative light and electron microscopy. *Methods Cell Biol.* 124, 55–70.
- Fernandez de Castro, I., Fernandez, J.J., Barajas, D., Nagy, P.D., Risco, C., 2017. Three-dimensional imaging of the intracellular assembly of a functional viral RNA replicase complex. *J. Cell. Sci.* 130, 260–268.
- Ferraris, O., Moroso, M., Pernet, O., Emonet, S., Ferrier Rembert, A., Paranhos-Baccala, G., Peyrefitte, C.N., 2015. Evaluation of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in vitro inhibition by chloroquine and chlorpromazine, two FDA approved molecules. *Antiviral Res.* 118, 75–81.
- Flisiak, R., Horban, A., Gallay, P., Bobardt, M., Selvarajah, S., Wiercinska-Drapalo, A., Siwak, E., Cielniak, I., Higersberger, J., Kierkus, J., Aeschlimann, C., Grosurin, P., Nicolas-Metral, V., Dumont, J.M., Porchet, H., Crabbe, R., Scalfaro, P., 2008. The cyclophilin inhibitor Debio-025 shows potent anti-hepatitis C effect in patients co-infected with hepatitis C and human immunodeficiency virus. *Hepatology* 47, 817–826.
- Francis, A.C., Melikyan, G.B., 2018. Live-cell imaging of early steps of single HIV-1. *Infection. Viruses* 10.
- Franke, E.K., Yuan, H.E., Luban, J., 1994. Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature* 372, 359–362.
- Gheorghiade, M., van Veldhuisen, D.J., Colucci, W.S., 2006. Contemporary use of digoxin in the management of cardiovascular disorders. *Circulation* 113, 2556–2564.
- Grosso, F., Stoilov, P., Lingwood, C., Brown, M., Cochrane, A., 2017. Suppression of adenovirus replication by cardiotonic steroids. *J. Virol.* 91.
- Guo, J., Xu, X., Rasheed, T.K., Yoder, A., Yu, D., Liang, H., Yi, F., Hawley, T., Jin, T., Ling, B., Wu, Y., 2013. Genistein interferes with SDF-1- and HIV-mediated actin dynamics and inhibits HIV infection of resting CD4 T cells. *Retrovirology* 10, 62.
- Hamamoto, I., Harazaki, K., Inase, N., Takaku, H., Tashiro, M., Yamamoto, N., 2013. Cyclosporin A inhibits the propagation of influenza virus by interfering with a late event in the virus life cycle. *Jpn. J. Infect. Dis.* 66, 276–283.
- Handsbumacher, R.E., Harding, M.W., Rice, J., Drugge, R.J., Speicher, D.W., 1984. Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science* 226, 544–547.
- Hartley, C., Hartley, M., Pardoe, I., Knight, A., 2006. Ionic Contra-Viral Therapy (ICVT): a new approach to the treatment of DNA virus infections. *Arch. Virol.* 151, 2495–2501.
- Hartono, C., Muthukumar, T., Suthanthiran, M., 2013. Immunosuppressive drug therapy. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 3, a015487.
- Hellstrom, K., Vihinen, H., Kallio, K., Jokitalo, E., Ahola, T., 2015. Correlative light and electron microscopy enables viral replication studies at the ultrastructural level. *Methods* 90, 49–56.
- Henry, S.D., Metselaar, H.J., Lonsdale, R.C., Kok, A., Haagmans, B.L., Tilanus, H.W., van der Laan, L.J., 2006. Mycophenolic acid inhibits hepatitis C virus replication and acts in synergy with cyclosporin A and interferon-alpha. *Gastroenterology* 131, 1452–1462.
- Hoenen, T., 2017. Luciferase-expressing Ebolaviruses as tools for screening of antivirals. *Methods Mol. Biol.* 1628, 189–194.
- Howard, C.R., Fletcher, N.F., 2012. Emerging virus diseases: can we ever expect the unexpected? *Emerg. Microbes Infect.* 1, e46.
- Hsin, Y.H., Chen, C.F., Huang, S., Shih, T.S., Lai, P.S., Chueh, P.J., 2008. The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. *Toxicol. Lett.* 179, 130–139.
- Huh, J.R., Leung, M.W., Huang, P., Ryan, D.A., Krout, M.R., Malapaka, R.R., Chow, J., Manel, N., Ciofani, M., Kim, S.V., Cuesta, A., Santori, F.R., Lafaille, J.J., Xu, H.E., Jin, D.Y., Rastinejad, F., Littman, D.R., 2011. Digoxin and its derivatives suppress TH17 cell differentiation by antagonizing RORgamma activity. *Nature* 472, 486–490.
- Ishida, J., Konishi, M., Ebner, N., Springer, J., 2016. Repurposing of approved cardiovascular drugs. *J. Transl. Med.* 14, 269.
- Iyidogan, P., Anderson, K.S., 2014. Current perspectives on HIV-1 antiretroviral drug resistance. *Viruses* 6, 4095–4139.
- Jha, B.K., Dong, B., Nguyen, C.T., Polyakova, I., Silverman, R.H., 2013. Suppression of antiviral innate immunity by sunitinib enhances oncolytic virotherapy. *Mol. Ther.* 21, 1749–1757.
- Jones, K.E., Patel, N.G., Levy, M.A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J.L., Daszak, P., 2008. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 451, 990–993.
- Kapoor, A., Cai, H., Forman, M., He, R., Shamay, M., Arav-Boger, R., 2012. Human cytomegalovirus inhibition by cardiac glycosides: evidence for involvement of the HERG gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 4891–4899.
- Kaul, A., Stauffer, S., Berger, C., Peltel, T., Schmitt, J., Kallis, S., Zayas, M., Lohmann, V., Luban, J., Bartenschlager, R., 2009. Essential role of cyclophilin A for hepatitis C virus replication and virus production and possible link to polyprotein cleavage kinetics. *PLoS Pathog.* 5, e1000546.
- Kaur, R., Klichko, V., Margolis, D., 2005. Ex vivo modeling of the effects of mycophenolic acid on HIV infection: considerations for antiviral therapy. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 21, 116–124.
- Keyaerts, E., Vijgen, L., Maes, P., Neyts, J., Van Ranst, M., 2004. In vitro inhibition of

- severe acute respiratory syndrome coronavirus by chloroquine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 323, 264–268.
- Khan, M., Santhosh, S.R., Tiwari, M., Lakshmana Rao, P.V., Parida, M., 2010. Assessment of in vitro prophylactic and therapeutic efficacy of chloroquine against Chikungunya virus in vero cells. *J. Med. Virol.* 82, 817–824.
- Kim, J.S., Kuk, E., Yu, K.N., Kim, J.H., Park, S.J., Lee, H.J., Kim, S.H., Park, Y.K., Park, Y.H., Hwang, C.Y., Kim, Y.K., Lee, Y.S., Jeong, D.H., Cho, M.H., 2007. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine* 3, 95–101.
- Kone, B.C., Kaleta, M., Gullans, S.R., 1988. Silver ion (Ag⁺)-induced increases in cell membrane K⁺ and Na⁺ permeability in the renal proximal tubule: reversal by thiol reagents. *J. Membr. Biol.* 102, 11–19.
- Kovackova, S., Chang, L., Bekerman, E., Neveu, G., Barouch-Bentov, R., Chaikvad, A., Heroven, C., Sala, M., De Jonghe, S., Knapp, S., Einav, S., Herdewijn, P., 2015. Selective inhibitors of cyclin G associated kinase (GAK) as anti-hepatitis C agents. *J. Med. Chem.* 58, 3393–3410.
- Lai, Y.C., Chuang, Y.C., Chang, C.P., Lin, Y.S., Perng, G.C., Wu, H.C., Hsieh, S.L., Yeh, T.M., 2018. Minocycline suppresses dengue virus replication by down-regulation of macrophage migration inhibitory factor-induced autophagy. *Antiviral Res.* 155, 28–38.
- Laird, G.M., Eisele, E.E., Rabi, S.A., Nikolaeva, D., Siliciano, R.F., 2014. A novel cell-based high-throughput screen for inhibitors of HIV-1 gene expression and budding identifies the cardiac glycosides. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 988–994.
- Lara, H.H., Ayala-Nunez, N.V., Ixtepan-Turrent, L., Rodriguez-Padilla, C., 2010a. Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1. *J. Nanobiotechnology* 8, 1.
- Lara, H.H., Ixtepan-Turrent, L., Garza-Trevino, E.N., Rodriguez-Padilla, C., 2010b. PVP-coated silver nanoparticles block the transmission of cell-free and cell-associated HIV-1 in human cervical culture. *J. Nanobiotechnology* 8, 15.
- Leela, S.L., Srisawat, C., Sreekanth, G.P., Noisakran, S., Yenchitsomanus, P.T., Limjindaporn, T., 2016. Drug repurposing of minocycline against dengue virus infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 478, 410–416.
- Lemaitre, M., Guetard, D., Henin, Y., Montagnier, L., Zerial, A., 1990. Protective activity of tetracycline analogs against the cytopathic effect of the human immunodeficiency viruses in CEM cells. *Res. Virol.* 141, 5–16.
- Li, G., De Clercq, E., 2017. Current therapy for chronic hepatitis C: the role of direct-acting antivirals. *Antiviral Res.* 142, 83–122.
- Li, J., Chen, C., Wong, G., Dong, W., Zheng, W., Li, Y., Sun, L., Zhang, L., Gao, G.F., Bi, Y., Liu, W., 2016. Cyclophilin A protects mice against infection by influenza A virus. *Sci. Rep.* 6, 28978.
- Li, C., Zhu, X., Ji, X., Quanquin, N., Deng, Y.Q., Tian, M., Aliyari, R., Zuo, X., Yuan, L., Afridi, S.K., Li, X.F., Jung, J.U., Nielsen-Saines, K., Qin, F.X., Qin, C.F., Xu, Z., Cheng, G., 2017. Chloroquine, a FDA-approved drug, prevents Zika virus infection and its associated congenital microcephaly in mice. *EBioMedicine* 24, 189–194.
- Lin, K., Gallay, P., 2013. Curing a viral infection by targeting the host: the example of cyclophilin inhibitors. *Antiviral Res.* 99, 68–77.
- Liu, X., Sun, L., Yu, M., Wang, Z., Xu, C., Xue, Q., Zhang, K., Ye, X., Kitamura, Y., Liu, W., 2009. Cyclophilin A interacts with influenza A virus M1 protein and impairs the early stage of the viral replication. *Cell. Microbiol.* 11, 730–741.
- Liu, X., Zhao, Z., Li, Z., Xu, C., Sun, L., Chen, J., Liu, W., 2012a. Cyclosporin A inhibits the influenza virus replication through cyclophilin A-dependent and -independent pathways. *PLoS One* 7, e37277.
- Liu, X., Zhao, Z., Xu, C., Sun, L., Chen, J., Zhang, L., Liu, W., 2012b. Cyclophilin A restricts influenza A virus replication through degradation of the M1 protein. *PLoS One* 7, e31063.
- Liu, Y., Yang, R., He, Z., Gao, W.Q., 2013. Generation of functional organs from stem cells. *Cell Regen. (Lond.)* 2, 1.
- Lowen, R.G., Bocan, T.M., Kane, C.D., Cazares, L.H., Kota, K.P., Ladner, J.T., Nasar, F., Pitt, L., Smith, D.R., Soloveva, V., Sun, M.G., Zeng, X., Bavari, S., 2018. Countering Zika virus: the USAMRIID response. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1062, 303–318.
- Lu, L., Sun, R.W., Chen, R., Hui, C.K., Ho, C.M., Luk, J.M., Lau, G.K., Che, C.M., 2008. Silver nanoparticles inhibit hepatitis B virus replication. *Antivir. Ther. (Lond.)* 13, 253–262.
- Luo, C., Luo, H., Zheng, S., Gui, C., Yue, L., Yu, C., Sun, T., He, P., Chen, J., Shen, J., Luo, X., Li, Y., Liu, H., Bai, D., Shen, J., Yang, Y., Li, F., Zuo, J., Hilgenfeld, R., Pei, G., Chen, K., Shen, X., Jiang, H., 2004. Nucleocapsid protein of SARS coronavirus tightly binds to human cyclophilin A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 321, 557–565.
- Ma, C., Li, F., Musharrafieh, R.G., Wang, J., 2016. Discovery of cyclosporine A and its analogs as broad-spectrum anti-influenza drugs with a high in vitro genetic barrier of drug resistance. *Antiviral Res.* 133, 62–72.
- Madrid, P.B., Chopra, S., Manger, I.D., Gilfillan, L., Keepers, T.R., Shurtleff, A.C., Green, C.E., Iyer, L.V., Dilks, H.H., Davey, R.A., Kolokoltsov, A.A., Carrion Jr., R., Patterson, J.L., Bavari, S., Panchal, R.G., Warren, T.K., Wells, J.B., Moos, W.H., Burke, R.L., Tanga, M.J., 2013. A systematic screen of FDA-approved drugs for inhibitors of biological threat agents. *PLoS One* 8, e60579.
- Margolis, D., Heredia, A., Gaywee, J., Oldach, D., Drusano, G., Redfield, R., 1999. Abacavir and mycophenolic acid, an inhibitor of inosine monophosphate dehydrogenase, have profound and synergistic anti-HIV activity. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 21, 362–370.
- Martinez, M.G., Snapp, E.L., Perumal, G.S., Macaluso, F.P., Kielian, M., 2014. Imaging the alphavirus exit pathway. *J. Virol.* 88, 6922–6933.
- Martinez, J.P., Sasse, F., Bronstrup, M., Diez, J., Meyerhans, A., 2015. Antiviral drug discovery: broad-spectrum drugs from nature. *Nat. Prod. Rep.* 32, 29–48.
- Matsuda, S., Koyasu, S., 2000. Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacology* 47, 119–125.
- Mendel, D.B., Laird, A.D., Xin, X., Louie, S.G., Christensen, J.G., Li, G., Schreck, R.E., Abrams, T.J., Ngai, T.J., Lee, L.B., Murray, L.J., Carver, J., Chan, E., Moss, K.G., Haznedar, J.O., Sukbunthorn, J., Blake, R.A., Sun, L., Tang, C., Miller, T., Shirazian, S., McMahon, G., Cherrington, J.M., 2003. In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clin. Cancer Res.* 9, 327–337.
- Menendez-Arias, L., Alvarez, M., Pacheco, B., 2014. Nucleoside/nucleotide analog inhibitors of hepatitis B virus polymerase: mechanism of action and resistance. *Curr. Opin. Virol.* 8, 1–9.
- Mercorelli, B., Palu, G., Loregian, A., 2018. Drug Repurposing for Viral Infectious Diseases: How Far Are We? *Trends Microbiol.* 26, 865–876.
- Michaelis, M., Kleinschmidt, M.C., Doerr, H.W., Cinatl Jr., J., 2007. Minocycline inhibits West Nile virus replication and apoptosis in human neuronal cells. *J. Antimicrob. Chemother.* 60, 981–986.
- Mishra, M.K., Basu, A., 2008. Minocycline neuroprotects, reduces microglial activation, inhibits caspase 3 induction, and viral replication following Japanese encephalitis. *J. Neurochem.* 105, 1582–1595.
- Moffat, J.G., Vincent, F., Lee, J.A., Eder, J., Prunotto, M., 2017. Opportunities and challenges in phenotypic drug discovery: an industry perspective. *Nat. Rev. Drug Discov.* 16, 531–543.
- Morones, J.R., Elechiguerra, J.L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J.B., Ramirez, J.T., Yacamán, M.J., 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 16, 2346–2353.
- Mudhasani, R., Kota, K.P., Retterer, C., Tran, J.P., Whitehouse, C.A., Bavari, S., 2014. High content image-based screening of a protease inhibitor library reveals compounds broadly active against Rift Valley fever virus and other highly pathogenic RNA viruses. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e3095.
- Murugan, K., Aruna, P., Panneerselvam, C., Madhivayazhagan, P., Paulpandi, M., Subramaniam, J., Rajaganesh, R., Wei, H., Alsali, M.S., Devanesan, S., Nicoletti, M., Syuhei, B., Canale, A., Benelli, G., 2016. Fighting arboviral diseases: low toxicity on mammalian cells, dengue growth inhibition (in vitro), and mosquitoicidal activity of *Centrocercas clavulatum*-synthesized silver nanoparticles. *Parasitol. Res.* 115, 651–662.
- Nakagawa, M., Sakamoto, N., Enomoto, N., Tanabe, Y., Kanazawa, N., Koyama, T., Kurosaki, M., Maekawa, S., Yamashiro, T., Chen, C.H., Itsui, Y., Kakinuma, S., Watanabe, M., 2004. Specific inhibition of hepatitis C virus replication by cyclosporin A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313, 42–47.
- Nesher, M., Shpolansky, U., Rosen, H., Lichtstein, D., 2007. The digitalis-like steroid hormones: new mechanisms of action and biological significance. *Life Sci.* 80, 2093–2107.
- Neuman, B.W., Joseph, J.S., Saikatendu, K.S., Serrano, P., Chatterjee, A., Johnson, M.A., Liao, L., Klaus, J.P., Yates 3rd, J.R., Wuthrich, K., Stevens, R.C., Buchmeier, M.J., Kuhn, P., 2008. Proteomics analysis unravels the functional repertoire of coronavirus nonstructural protein 3. *J. Virol.* 82, 5279–5294.
- Neveu, G., Barouch-Bentov, R., Ziv-Av, A., Gerber, D., Jacob, Y., Einav, S., 2012. Identification and targeting of an interaction between a tyrosine motif within hepatitis C virus core protein and AP2M1 essential for viral assembly. *PLoS Pathog.* 8, e1002845.
- Neveu, G., Ziv-Av, A., Barouch-Bentov, R., Berkerman, E., Mulholland, J., Einav, S., 2015. AP-2-associated protein kinase 1 and cyclin G-associated kinase regulate hepatitis C virus entry and are potential drug targets. *J. Virol.* 89, 4387–4404.
- Nosengo, N., 2016. Can you teach old drugs new tricks? *Nature* 534, 314–316.
- Okuyama-Dobashi, K., Kasai, H., Tanaka, T., Yamashita, A., Yasumoto, J., Chen, W., Okamoto, T., Maekawa, S., Watashi, K., Wakita, T., Ryo, A., Suzuki, T., Matsuura, Y., Enomoto, N., Moriishi, K., 2015. Hepatitis B virus efficiently infects non-adherent hepatoma cells via human sodium taurocholate cotransporting polypeptide. *Sci. Rep.* 5, 17047.
- Ooi, E.E., Chew, J.S., Loh, J.P., Chua, R.C., 2006. In vitro inhibition of human influenza A virus replication by chloroquine. *Virol. J.* 3, 39.
- Paeshuyse, J., Kaul, A., De Clercq, E., Rosenwirth, B., Dumont, J.M., Scalfaro, P., Bartschlagher, R., Neyts, J., 2006. The non-immunosuppressive cyclosporin DEBIO-025 is a potent inhibitor of hepatitis C virus replication in vitro. *Hepatology* 43, 761–770.
- Pan, Q., de Ruiter, P.E., Metselaar, H.J., Kwekkeboom, J., de Jonge, J., Tilanus, H.W., Janssen, H.L., van der Laan, L.J., 2012. Mycophenolic acid augments interferon-stimulated gene expression and inhibits hepatitis C Virus infection in vitro and in vivo. *Hepatology* 55, 1673–1683.
- Panchal, R.G., Kota, K.P., Spurgers, K.B., Ruthel, G., Tran, J.P., Boltz, R.C., Bavari, S., 2010. Development of high-content imaging assays for lethal viral pathogens. *J. Biomol. Screen.* 15, 755–765.
- Papp, I., Sieben, C., Ludwig, K., Roskamp, M., Bottcher, C., Schlecht, S., Herrmann, A., Haag, R., 2010. Inhibition of influenza virus infection by multivalent sialic-acid-functionalized gold nanoparticles. *Small* 6, 2900–2906.
- Paton, N.I., Lee, L., Xu, Y., Ooi, E.E., Cheung, Y.B., Archuleta, S., Wong, G., Wilder-Smith, A., 2011. Chloroquine for influenza prevention: a randomised, double-blind, placebo controlled trial. *Lancet Infect. Dis.* 11, 677–683.
- Perales, C., Quer, J., Gregori, J., Esteban, J.L., Domingo, E., 2015. Resistance of hepatitis C virus to inhibitors: complexity and clinical implications. *Viruses* 7, 5746–5766.
- Pfefferle, S., Schopf, J., Kogl, M., Friedel, C.C., Muller, M.A., Carbajo-Lozoya, J., Stellberger, T., von Dall'Armi, E., Herzog, P., Kallies, S., Niemeier, D., Ditt, V., Kuri, T., Züst, R., Pumpor, K., Hilgenfeld, R., Schwarz, F., Zimmer, R., Steffen, I., Weber, F., Thiel, V., Herrler, G., Thiel, H.J., Schwegmann-Wessels, C., Pohlmann, S., Haas, J., Drosten, C., von Brunn, A., 2011. The SARS-coronavirus-host interactome: identification of cyclophilins as target for pan-coronavirus inhibitors. *PLoS Pathog.* 7, e1002331.
- Pollastri, M.P., Campbell, R.K., 2011. Target repurposing for neglected diseases. *Future Med. Chem.* 3, 1307–1315.
- Prassas, I., Diamandis, E.P., 2008. Novel therapeutic applications of cardiac glycosides.

- Nat. Rev. Drug Discov. 7, 926–935.
- Pu, S.Y., Xiao, F., Schor, S., Bekerman, E., Zanini, F., Barouch-Bentov, R., Nagamine, C.M., Einav, S., 2018. Feasibility and biological rationale of repurposing sunitinib and erlotinib for dengue treatment. *Antiviral Res.* 155, 67–75.
- Rainsford, K.D., Parke, A.L., Clifford-Rashotte, M., Kean, W.F., 2015. Therapy and pharmacological properties of hydroxychloroquine and chloroquine in treatment of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and related diseases. *Inflammopharmacology* 23, 231–269.
- Randolph, V.B., Winkler, G., Stollar, V., 1990. Acidotropic amines inhibit proteolytic processing of flavivirus prM protein. *Virology* 174, 450–458.
- Risco, C., de Castro, I.F., Sanz-Sanchez, L., Narayan, K., Grandinetti, G., Subramaniam, S., 2014. Three-dimensional imaging of viral infections. *Annu. Rev. Virol.* 1, 453–473.
- Roques, P., Thiberville, S.D., Dupuis-Maguiraga, L., Lum, F.M., Labadie, K., Martinon, F., Gras, G., Lebon, P., Ng, L.F.P., de Lamballerie, X., Le Grand, R., 2018. Paradoxical effect of chloroquine treatment in enhancing Chikungunya virus infection. *Viruses* 10.
- Savarino, A., Lucia, M.B., Rastrelli, E., Rutella, S., Golotta, C., Morra, E., Tamburrini, E., Perno, C.F., Boelaert, J.R., Sperber, K., Cauda, R., 2004. Anti-HIV effects of chloroquine: inhibition of viral particle glycosylation and synergism with protease inhibitors. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 35, 223–232.
- Schiltknecht, E., Ada, G.L., 1985. In vivo effects of cyclosporine on influenza A virus-infected mice. *Cell. Immunol.* 91, 227–239.
- Schmid, F.X., 1995. Protein folding. Prolyl isomerases join the fold. *Curr. Biol.* 5, 993–994.
- Schor, S., Einav, S., 2018. Repurposing of kinase inhibitors as broad-spectrum antiviral drugs. *DNA Cell Biol.* 37, 63–69.
- Schreiber, S.L., 1991. Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. *Science* 251, 283–287.
- Sharma, D., Priyadarshini, P., Vratil, S., 2015. Unraveling the web of viroinformatics: computational tools and databases in virus research. *J. Virol.* 89, 1489–1501.
- Sharp, P.M., Hahn, B.H., 2011. Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 1, a006841.
- Shiryaev, S.A., Mesci, P., Pinto, A., Fernandes, I., Sheets, N., Shresta, S., Farhy, C., Huang, C.T., Strongin, A.Y., Muotri, A.R., Terskikh, A.V., 2017. Repurposing of the anti-malaria drug chloroquine for Zika Virus treatment and prophylaxis. *Sci. Rep.* 7, 15771.
- Slater, A.F., 1993. Chloroquine: mechanism of drug action and resistance in *Plasmodium falciparum*. *Pharmacol. Ther.* 57, 203–235.
- Smith, T.W., 1988. Digitalis. Mechanisms of action and clinical use. *N. Engl. J. Med.* 318, 358–365.
- Sourisseau, M., Schilte, C., Casartelli, N., Trouillet, C., Guivel-Benhassine, F., Rudnicka, D., Sol-Foulon, N., Le Roux, K., Prevost, M.C., Fsihi, H., Frenkiel, M.P., Blanchet, F., Afonso, P.V., Ceccaldi, P.E., Ozden, S., Gessain, A., Schuffenecker, I., Verhasselt, B., Zamborlini, A., Saib, A., Rey, F.A., Arenzana-Seisdedos, F., Despres, P., Michault, A., Albert, M.L., Schwartz, O., 2007. Characterization of reemerging chikungunya virus. *PLoS Pathog.* 3, e89.
- Sperber, K., Kalb, T.H., Stecher, V.J., Banerjee, R., Mayer, L., 1993. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by hydroxychloroquine in T cells and monocytes. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 9, 91–98.
- Speshock, J.L., Murdock, R.C., Braydich-Stolle, L.K., Schrand, A.M., Hussain, S.M., 2010. Interaction of silver nanoparticles with Tacaribe virus. *J. Nanobiotechnology* 8, 19.
- Su, S., Bi, Y., Wong, G., Gray, G.C., Gao, G.F., Li, S., 2015. Epidemiology, evolution, and recent outbreaks of avian influenza virus in China. *J. Virol.* 89, 8671–8676.
- Sujitha, V., Murugan, K., Paulpandi, M., Panneerselvam, C., Suresh, U., Roni, M., Nicoletti, M., Higuchi, A., Madhiyazhagan, P., Subramaniam, J., Dinesh, D., Vadivalagan, C., Chandramohan, B., Alarfaj, A.A., Munusamy, M.A., Barnard, D.R., Benelli, G., 2015. Green-synthesized silver nanoparticles as a novel control tool against dengue virus (DEN-2) and its primary vector *Aedes aegypti*. *Parasitol. Res.* 114, 3315–3325.
- Sun, L., Liang, C., Shirazian, S., Zhou, Y., Miller, T., Cui, J., Fukuda, J.Y., Chu, J.Y., Nematalla, A., Wang, X., Chen, H., Sistla, A., Luu, T.C., Tang, F., Wei, J., Tang, C., 2003. Discovery of 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial and platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase. *J. Med. Chem.* 46, 1116–1119.
- Sun, R.W., Chen, R., Chung, N.P., Ho, C.M., Lin, C.L., Che, C.M., 2005. Silver nanoparticles fabricated in Hepes buffer exhibit cytoprotective activities toward HIV-1 infected cells. *Chem. Commun. (Camb.)* 5059–5061.
- Szeto, G.L., Brice, A.K., Yang, H.C., Barber, S.A., Siliciano, R.F., Clements, J.E., 2010. Minocycline attenuates HIV infection and reactivation by suppressing cellular activation in human CD4+ T cells. *J. Infect. Dis.* 201, 1132–1140.
- Takebe, T., Enomura, M., Yoshizawa, E., Kimura, M., Koike, H., Ueno, Y., Matsuzaki, T., Yamazaki, T., Toyohara, T., Osafune, K., Nakauchi, H., Yoshikawa, H.Y., Taniguchi, H., 2015. Vascularized and Complex Organ Buds from Diverse Tissues via Mesenchymal Cell-Driven Condensation. *Cell Stem Cell* 16, 556–565.
- Takampunya, R., Ubol, S., Hough, H.S., Cameron, C.E., Padmanabhan, R., 2006. Inhibition of dengue virus replication by mycophenolic acid and ribavirin. *J. Gen. Virol.* 87, 1947–1952.
- Tan, K.H., Ki, K.C., Watanabe, S., Vasudevan, S.G., Krishnan, M., 2014. Cell-based flavivirus infection (CFI) assay for the evaluation of dengue antiviral candidates using high-content imaging. *Methods Mol. Biol.* 1138, 99–109.
- Tanner, W.D., Toth, D.J., Gundlapalli, A.V., 2015. The pandemic potential of avian influenza A(H7N9) virus: a review. *Epidemiol. Infect.* 143, 3359–3374.
- Tenorio, R., Fernandez de Castro, I., Knowlton, J.J., Zamora, P.F., Lee, C.H., Mainou, B.A., Dermody, T.S., Risco, C., 2018. Reovirus sigmaNS and muNS proteins remodel the endoplasmic reticulum to build replication neo-organelles. *MBio* 9.
- Thali, M., Bukovsky, A., Kondo, E., Rosenwirth, B., Wals, C.T., Sodroski, J., Gottlinger, H.G., 1994. Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions. *Nature* 372, 363–365.
- Thome, R., Lopes, S.C., Costa, F.T., Verinaud, L., 2013. Chloroquine: modes of action of an undervalued drug. *Immunol. Lett.* 153, 50–57.
- Thorley, A.J., Tetley, T.D., 2013. New perspectives in nanomedicine. *Pharmacol. Ther.* 140, 176–185.
- To, K.K., Zhou, J., Chan, J.F., Yuen, K.Y., 2015. Host genes and influenza pathogenesis in humans: an emerging paradigm. *Curr. Opin. Virol.* 14, 7–15.
- Tricou, V., Minh, N.N., Van, T.P., Lee, S.J., Farrar, J., Wills, B., Tran, H.T., Simmons, C.P., 2010. A randomized controlled trial of chloroquine for the treatment of dengue in Vietnamese adults. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, e785.
- Tsai, W.P., Nara, P.L., Kung, H.F., Oroszlan, S., 1990. Inhibition of human immunodeficiency virus infectivity by chloroquine. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 6, 481–489.
- Ullah Khan, S., Saleh, T.A., Wahab, A., Khan, M.H.U., Khan, D., Ullah Khan, W., Rahim, A., Kamal, S., Ullah Khan, F., Fahad, S., 2018. Nanosilver: new ageless and versatile biomedical therapeutic scaffold. *Int. J. Nanomedicine* 13, 733–762.
- Vaklavas, C., Chatzizisis, Y.S., Tsimberidou, A.M., 2011. Common cardiovascular medications in cancer therapeutics. *Pharmacol. Ther.* 130, 177–190.
- Vincent, M.J., Bergeron, E., Benjannet, S., Erickson, B.R., Rollin, P.E., Ksiazek, T.G., Seidah, N.G., Nichol, S.T., 2005. Chloroquine is a potent inhibitor of SARS coronavirus infection and spread. *Virol. J.* 2, 69.
- Wainberg, M.A., Dascal, A., Blain, N., Fitz-Gibbon, L., Boulterice, F., Numazaki, K., Tremblay, M., 1988. The effect of cyclosporine A on infection of susceptible cells by human immunodeficiency virus type 1. *Blood* 72, 1904–1910.
- Walters, M.S., Gomi, K., Ashbridge, B., Moore, M.A., Arbelaez, V., Heldrich, J., Ding, B.S., Rafii, S., Staudt, M.R., Crystal, R.G., 2013. Generation of a human airway epithelium derived basal cell line with multipotent differentiation capacity. *Respir. Res.* 14, 135.
- Watahi, K., Sluder, A., Daito, T., Matsunaga, S., Ryo, A., Nagamori, S., Iwamoto, M., Nakajima, S., Tsukuda, S., Boroto-Esoda, K., Sugiyama, M., Tanaka, Y., Kanai, Y., Kusuhara, H., Mizokami, M., Wakita, T., 2014. Cyclosporin A and its analogs inhibit hepatitis B virus entry into cultured hepatocytes through targeting a membrane transporter, sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP). *Hepatology* 59, 1726–1737.
- White, N.J., 1996. The treatment of malaria. *N. Engl. J. Med.* 335, 800–806.
- Witte, R., Andriasyan, V., Georgi, F., Yakimovich, A., Greber, U.F., 2018. Concepts in Light Microscopy of Viruses. *Viruses* 10.
- Wong, R.W., Balachandran, A., Ostrowski, M.A., Cochrane, A., 2013. Digoxin suppresses HIV-1 replication by altering viral RNA processing. *PLoS Pathog.* 9, e1003241.
- Xiang, D.X., Chen, Q., Pang, L., Zheng, C.L., 2011. Inhibitory effects of silver nanoparticles on H1N1 influenza A virus in vitro. *J. Virol. Methods* 178, 137–142.
- Xiang, D., Zheng, Y., Duan, W., Li, X., Yin, J., Shigdar, S., O'Connor, M.L., Marappan, M., Zhao, X., Miao, Y., Xiang, B., Zheng, C., 2013. Inhibition of A/Human/Hubei/3/2005 (H3N2) influenza virus infection by silver nanoparticles in vitro and in vivo. *Int. J. Nanomedicine* 8, 4103–4113.
- Yan, Y., Zou, Z., Sun, Y., Li, X., Xu, K.F., Wei, Y., Jin, N., Jiang, C., 2013. Anti-malaria drug chloroquine is highly effective in treating avian influenza A H5N1 virus infection in an animal model. *Cell Res.* 23, 300–302.
- Yang, F., Robotham, J.M., Nelson, H.B., Irsigler, A., Kenworthy, R., Tang, H., 2008. Cyclophilin A is an essential cofactor for hepatitis C virus infection and the principal mediator of cyclosporine resistance in vitro. *J. Virol.* 82, 5269–5278.
- Yuan, S., Chan, J.F., den-Haan, H., Chik, K.K., Zhang, A.J., Chan, C.C., Poon, V.K., Yip, C.C., Mak, W.W., Zhu, Z., Zou, Z., Tee, K.M., Cai, J.P., Chan, K.H., de la Pena, J., Perez-Sanchez, H., Ceron-Carrasco, J.P., Yuen, K.Y., 2017. Structure-based discovery of clinically approved drugs as Zika virus NS2B-NS3 protease inhibitors that potentially inhibit Zika virus infection in vitro and in vivo. *Antiviral Res.* 145, 33–43.
- Zeisel, M.B., Lupberger, J., Fofana, I., Baumert, T.F., 2013. Host-targeting agents for prevention and treatment of chronic hepatitis C - perspectives and challenges. *J. Hepatol.* 58, 375–384.
- Zhu, J.D., Meng, W., Wang, X.J., Wang, H.C., 2015. Broad-spectrum antiviral agents. *Front. Microbiol.* 6, 517.
- Zink, M.C., Uhrhlab, J., DeWitt, J., Voelker, T., Bullock, B., Mankowski, J., Tarwater, P., Clements, J., Barber, S., 2005. Neuroprotective and anti-human immunodeficiency virus activity of minocycline. *JAMA* 293, 2003–2011.